

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
im Klinikum Großhadern
der Ludwigs-Maximilians-Universität München
(PD Dr. Lars Lindner)

**Zielgerichtete Chemotherapie solider Tumoren
durch thermosensitive Liposomen in Kombination mit
Doxorubicin, Gemcitabin und Mitomycin C**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Simone Limmer
aus Innsbruck

München 2014

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Tag der Promotion: 12. Juli 2014

*In Liebe
meiner Mama und meinem Papa
gewidmet*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Grundlagen.....	3
2.1	Liposomen	3
2.1.1	Phasenumwandlung von Phospholipiden.....	4
2.1.2	Langzirkulierende Liposomen	5
2.1.3	Thermosensitive Liposomen	6
2.2	Wirkstoffe.....	9
2.2.1	Doxorubicin	9
2.2.2	Gemcitabin	10
2.2.3	Mitomycin C	11
2.3	Hyperthermie	11
2.4	Das Blasenkarzinom	14
2.5	Zielsetzung	15
3	Material	17
3.1	Liposomen	17
3.1.1	Lipide.....	17
3.1.2	Zytostatika.....	18
3.2	Zellkultur	18
3.2.1	Zelllinien.....	18
3.3	Tierversuche	19
3.3.1	Versuchstiere	19
4	Methoden	21
4.1	Liposomen	21
4.1.1	Liposomenherstellung	21
4.1.2	Wirkstoffeinschluss.....	22
4.1.3	Liposomencharakterisierung	24
4.1.4	Konzentrationsbestimmung in Liposomen.....	25
4.1.5	Temperaturabhängige Mitomycin C-Freisetzung	27
4.2	Zellkultur	28

4.2.1 Zellkultivierung	28
4.2.2 Passagieren der Zellen	28
4.2.3 Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer Zählkammer	29
4.2.4 Auftauen und Einfrieren von Zellen	30
4.2.5 Mykoplasmentest	30
4.2.6 Vitalitätsbestimmung	31
4.2.7 Zytotoxizitätstest.....	31
4.2.8 Vorbereitungen für Tierversuche	34
4.3 Tierversuche	34
4.3.1 Rahmenbedingungen	34
4.3.2 Anästhesie und Analgesie	35
4.3.3 Abbruch und Euthanasie	35
4.3.4 Pharmakokinetikstudien	36
4.3.5 Weichteilsarkom-Modell	37
4.3.6 Blasenkarzinom-Modell	40
4.4 Konzentrationsbestimmung im Probenmaterial	44
4.4.1 Doxorubicinbestimmung in Plasma- und Gewebeproben.....	44
4.4.2 Gemcitabinbestimmung in wässrigen Proben	44
4.4.3 Mitomycin C-Bestimmung in wässrigen Proben	45
5 Ergebnisse.....	46
5.1 Liposomen	46
5.1.1 Charakterisierung von Mitomycin C-Liposomen	46
5.1.2 Temperaturabhängige Mitomycin C-Freisetzung	47
5.2 Zellkultur	47
5.3 Tierversuche	52
5.3.1 Liposomenstabilität <i>in vivo</i>	52
5.3.2 Therapiestudie Gemcitabin	56
5.3.3 Etablierung Blasenkarzinom-Modell.....	57
5.3.4 Anreicherungsstudie und Organverteilung	62
6 Diskussion.....	71
6.1 Zytotoxizitätstest	71
6.2 Liposomencharakterisierung TSL(Mito)	75
6.3 Liposomenstabilität	76

6.3.1	TSL(Mito)	76
6.3.2	TSL(Dox).....	78
6.3.3	TSL(Gem)	81
6.4	Anreicherung und Gewebeverteilung von TSL(Dox) im neuartigen Blasenkarzinom–Modell.....	83
6.4.1	Etablierung Tiermodell	83
6.4.2	Anreicherung und Gewebeverteilung von TSL(Dox)	87
6.5	Therapie mit TSL(Gem) am s.c. Weichteilsarkom-Modell.....	93
7	Zusammenfassung	98
8	Summary.....	101
9	Literaturverzeichnis.....	103
10	Anhang.....	114
10.1	Materialien	114
10.1.1	Liposomen	114
10.1.2	Zellkultur	118
10.1.3	Tierversuche.....	120
10.1.4	HPLC Analytik.....	122
10.1.5	Software	125
10.2	Abkürzungsverzeichnis	126
10.3	Tabellenverzeichnis	128
10.4	Abbildungsverzeichnis	130
10.5	Veröffentlichungen.....	132

1 Einleitung

Laut World Health Organization gab es 2012 weltweit 14,1 Millionen Krebsneuerkrankungen und 8,2 Millionen Menschen, die an Krebs starben. Somit zählt diese Krankheit zu den Haupttodesursachen [1]. Vergleicht man die Neuerkrankungs- und Sterberate von Krebs in Deutschland mit der anderer entwickelter Staaten, liegt Deutschland mit 477.300 Neuerkrankungen im Mittelfeld [2].

Für die Therapie solider Tumoren stehen als Therapieoptionen die chirurgische Exzision, Strahlentherapie und medikamentöse Therapie zur Verfügung. Die Auswahl der Therapie richtet sich nach Tumorart, Lokalisation, Größe, Malignität, dem Vorhandensein von Metastasen sowie nach der körperlichen Verfassung der Patienten. Aufgrund fehlender Spezifität klassischer Zytostatika für Tumorgewebe kommt es bei deren systemischen Applikation auch zur Schädigung von Normalgewebe. Daraus resultieren Nebenwirkungen wie Myelosuppression (Anämie, Thrombozytopenie, Leukopenie), Organtoxizität (z.B. Leber, Niere), Stomatitis, Alopezie, Nausea und Emesis. Dies sind dosislimitierende Faktoren in der Therapie.

Im Rahmen der medizinischen Forschung wird daher nach neuen, wirksameren Behandlungsmethoden gesucht. Regionale Tiefenhyperthermie mit dem Ziel der Erwärmung von Tumoren auf Temperaturen von 40 °C-43 °C wird in Kombination mit Strahlentherapie oder Chemotherapie seit einigen Jahren erfolgreich zur Behandlung von Tumoren eingesetzt. Hyperthermie (HT) in Kombination mit Chemotherapie führte in einer randomisierten Phase-III-Studie bei Patienten mit Hochrisikoweichteilsarkomen zu einer Verlängerung des lokal progressionsfreien sowie krankheitsfreien Überlebens [3].

Eine Weiterentwicklung ist der Einschluss der Zytostatika in Liposomen. Durch die liposomale Membran soll gesundes Körpergewebe vor den

zytotoxischen Eigenschaften der Medikamente geschützt werden, um Nebenwirkungen zu reduzieren. Eine thermolabile Membranzusammensetzung soll ermöglichen, dass bei zielgerichteter Erwärmung der Wirkstoff im erkrankten Gewebe freigesetzt wird und dort seine zytotoxische Wirkung entfaltet. Eine neuartige, auf synthetischen Phosphatidyloligoglycerinen basierende Formulierung dieser thermosensitiven Liposomen (TSL), beladen mit unterschiedlichen Wirkstoffen, wurde in der vorliegenden Arbeit *in vitro* und *in vivo* untersucht.

2 Grundlagen

2.1 Liposomen

Fehlende Spezifität von Zytostatika und kurze Plasmahalbwertszeiten erfordern die Suche nach neuen Strategien in der Krebstherapie. Nanocarrier bieten die Möglichkeit, Wirkstoffe einzuschließen oder in ihre Membran einzubauen. Diese können im Rahmen der Therapie aktiv oder passiv im Zielgewebe angereichert werden und so lokal wirken [4,5].

Liposomen sind geschlossene, sphärische Nanopartikel bestehend aus einer Phospholipiddoppelschicht. Sie sind bicompatibel, können vom Körper abgebaut werden und besitzen die Fähigkeit, sowohl hydrophile als auch hydrophobe Wirkstoffe von ihrer Umgebung abzuschirmen [4, 6]. 1965 wurden Liposomen erstmals von Bangham et al. beschrieben [7]. Phospholipide sind wichtige Strukturelemente für die Ausbildung von Zellmembranen. Bei Endo- und Exozytose oder Porenbildung entstehen auf natürliche Weise rundliche Membranstrukturen. Diese sind vergleichbar mit der sphärischen Doppelmembran der künstlich hergestellten Liposomen (siehe Abbildung 1).

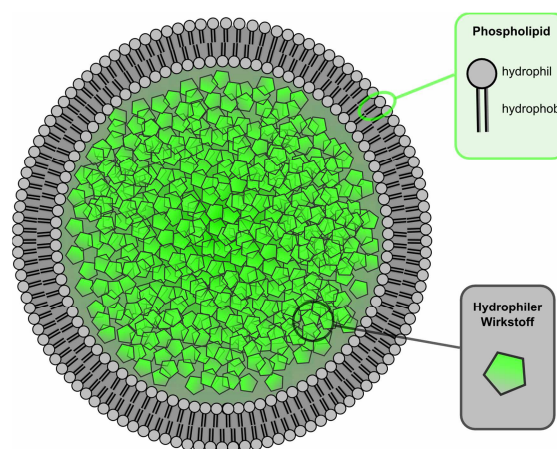


Abbildung 1 - Struktur und Aufbau eines Liposoms

Phospholipide bestehen aus einem hydrophoben „Schwanz“, der aus ein oder zwei Fettsäureketten besteht (siehe Abbildung 1, Abbildung 4). Die Fettsäuren sind über ein Glycerin- oder Sphingosinmolekül mit einer hydrophilen „Kopfgruppe“ aus beispielsweise Phosphocholin oder Phosphoglycerin verbunden (siehe Abbildung 1, Abbildung 4). Aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften orientieren sich die hydrophoben Anteile zueinander und die hydrophilen Kopfgruppen nach außen. Im wässrigen Milieu bilden die unlöslichen Phospholipide Molekülaggregate aus, die abhängig von den Packungsparametern, Volumen und Länge des hydrophoben Anteils und der Oberfläche des hydrophilen Kopfes unterschiedliche Strukturen ausbilden. So können Mizellen, inverse Mizellen oder lamellare Strukturen entstehen. Bei der Herstellung von Liposomen mit Doppelschichten ausbildenden Phospholipiden formen sich spontan multilamellare Vesikel. Diese können durch technische Verfahren wie Extrusion durch Filtermembranen, Ultraschall und Detergentiendialyse in unilamellare Liposomen überführt werden.

2.1.1 Phasenumwandlung von Phospholipiden

Phospholipide haben die Eigenschaften, temperaturabhängig ihre Konformation zu verändern (Phasenumwandlung) [8]. Die Temperatur, bei der diese Veränderung stattfindet, wird als Phasenumwandlungstemperatur (T_m) bezeichnet und ist für jedes Phospholipid spezifisch. Verantwortlich hierfür ist der Wechsel der Konformation innerhalb der Alkylketten der Fettsäuren bei Erwärmung von der trans- in die gauche-Stellung. Die Phasenumwandlung beeinflusst die Permeabilität der Liposomenmembran. Unterhalb der T_m befindet sich die Membran in der soliden Gelphase. Dabei verhindern die dicht gepackten Phospholipide die Diffusion über die Membran für nieder- und hochmolekulare Substanzen nahezu vollständig. Bei Temperaturen über der T_m liegt die Membran in der flüssig-kristallinen Phase vor, die aufgrund von ungeordneter Lipidanordnung und geringer Packungsdichte durchlässig für Moleküle ist. Während der Phasenumwandlung treten aufgrund der sich ändernden Lipidkonformation beide Phasen in der Membran nebeneinander auf. Die Unordnung in der Membran

führt zur Bildung von Lücken, die als „grain boundaries“ bezeichnet werden. Während der Phasenumwandlung ist die Permeabilität der Membran am höchsten. Die Lipidkomposition der Liposomen hat großen Einfluss auf die Temperatur, bei der sich die Phase der Membran ändert. Somit kann durch die Auswahl und Menge der entsprechenden mischbaren Phospholipide ein Liposom mit gewünschter T_m hergestellt werden. Zugabe von > 30 mol% Cholesterol bei der Liposomenherstellung verhindert das Auftreten einer Phasenumwandlung. Cholesterol erhöht die Packungsdichte der Lipide, weswegen es zur Membranstabilisierung bei langzirkulierenden Liposomen verwendet wird.

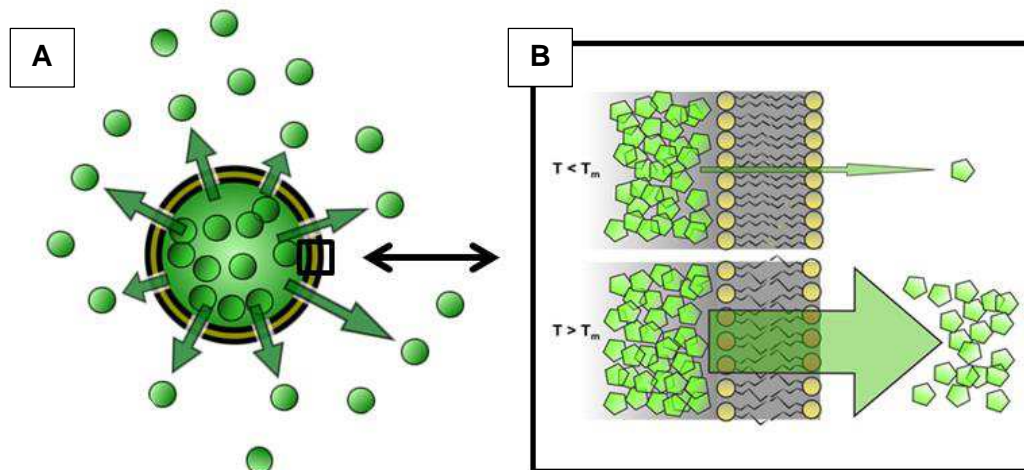


Abbildung 2 – Schematische Darstellung A der Freisetzung aus Liposomen und B der Membranphasen; $T < T_m$ solide Gelphase, niedrige Permeabilität für hydrophile Moleküle; $T > T_m$ flüssig-kristalline Phase, erhöhte Permeabilität für hydrophile Moleküle

2.1.2 Langzirkulierende Liposomen

Derzeit gibt es in Deutschland in der Krebstherapie nur zugelassene Liposomenpräparate mit stabilisierten Membraneigenschaften auf Cholesterolbasis. Dazu gehört das Doxorubicinpräparat Caelyx[®], das in der Therapie von Ovarial- und Mammakarzinomen Anwendung findet [6]. Durch die liposomale Verpackung von Doxorubicin (Dox) kommt es bei Caelyx[®] zu einer vermehrten Anreicherung im Tumorgewebe und zu einer Reduzierung

der Nebenwirkungen [6]. Fenestrierungen der Gefäße bilden eine Besonderheit im Tumorgewebe. Dadurch können große Moleküle wie langzirkulierendes Caelyx passiv im Tumorgewebe angereichert werden (engl. *enhanced permeability and retention effect*, EPR-Effekt) [9]. Allerdings verhindert die hohe Membranstabilität die vollständige Wirkstofffreisetzung bei diesem Präparat. Die fehlende Bioverfügbarkeit von Dox führt zu keiner therapeutischen Effizienzsteigerung im Vergleich mit freiem Wirkstoff [10]. Weitere eingesetzte liposomale Wirkstoffträger sind das Dox beladene Myocet[®] (Mammakarzinom) und das Cytarabin einschließende DepoCyt[®] (Meningiosis lymphomatosa) [6].

2.1.3 Thermosensitive Liposomen

Yatvin et al. beschrieben 1978 erstmals eine Liposomenformulierung mit einer Phasenumwandlung bei ~ 44 °C [11].

TSL ermöglichen eine wärmeinduzierte, zielgerichtet Wirkstofffreisetzung lokal im Tumorgewebe [12, 13]. In ihrer Eigenschaft als Trägersysteme mit thermolabilem Charakter ist die Lipidzusammensetzung der TSL so gewählt, dass die T_m knapp oberhalb der physiologischen Körpertemperatur (> 40 °C) liegt. Im Zusammenhang mit systemischer liposomaler Chemotherapie wird der verpackte Wirkstoff während der Zirkulation im Körper vor Abbauvorgängen geschützt. Bei Erreichen des auf T_m erwärmten Zielgewebes kann der Wirkstoff lokal aus den TSL freigesetzt werden (siehe Abbildung 3). Dies führt zu einer gesteigerten Wirkstoffakkumulation im Zielgewebe und verhindert die Anreicherung im gesunden Gewebe.

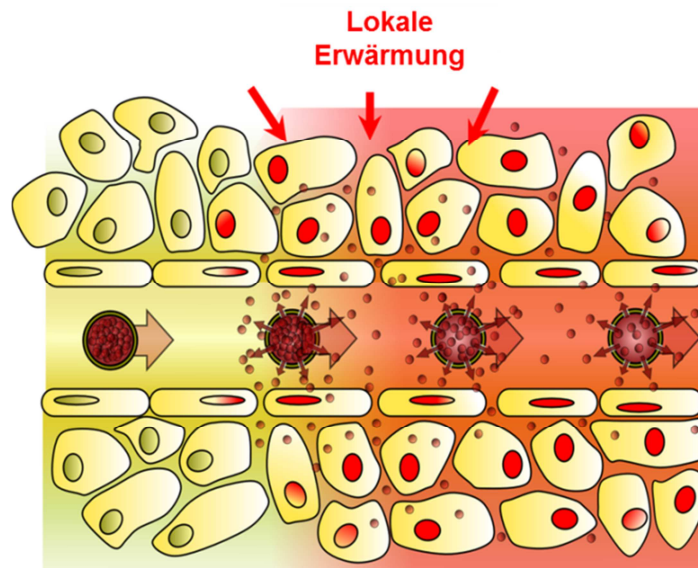


Abbildung 3 - Wärmeinduzierte intravaskuläre Wirkstofffreisetzung aus TSL und Wirkstoffakkumulation im Zielgewebe

ThermoDox[®] ist ein in den USA in der klinischen Prüfung befindliches TSL-Präparat. Es basiert auf Lysolipiden, die durch Wärme den eingeschlossenen Wirkstoff Dox freisetzen [14, 15]. Dadurch soll er, anders als bei Caelyx[®], bioverfügbar im Tumorgewebe angereichert werden. Allerdings verringern die Lysolipide die Stabilität der Liposomen. Die dadurch verkürzte Plasmahalbwertszeit ($t_{1/2}$) verhindert, dass ausreichend Dox beladene TSL das Tumorgewebe erreichen [16]. Somit ist auch mit diesem Präparat die Steigerung der Effizienz nur begrenzt möglich.

Die TSL Formulierung bestehend aus 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC), 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DSPC), 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphodiglycerin (DPPG₂) im molaren Verhältnis 50:20:30, die in dieser Arbeit verwendet werden soll, zeichnet sich aufgrund des synthetischen Lipids DPPG₂ durch hohe Stabilität bei Temperaturen um die Körpertemperatur und schnelle Freisetzung bei Erreichen der T_m aus [17]. Aufgrund der Lipidkomposition liegt die T_m bei 42,4 °C [17]. Diese TSL-Formulierung konnte mit eingeschlossenem Dox (TSL(Dox)) bereits ihren Vorteil gegenüber nicht liposomalem Dox, Caelyx[®] und ThermoDox[®] *in vitro* und *in vivo* beweisen [16].

Lipid	hydrophober Schwanz	hydrophile Kopfgruppe	T _m [°C]
DPPC	Palmitinsäure	Phosphocholin	41,5
DSPC	Stearinsäure	Phosphocholin	56
DPPG ₂	Palmitinsäure	Phosphodiglycerin	39,7

Tabelle 1 - Phospholipide; hydrophobe Fettsäureketten, hydrophile Kopfgruppen und Phasenumwandlungstemperatur T_m

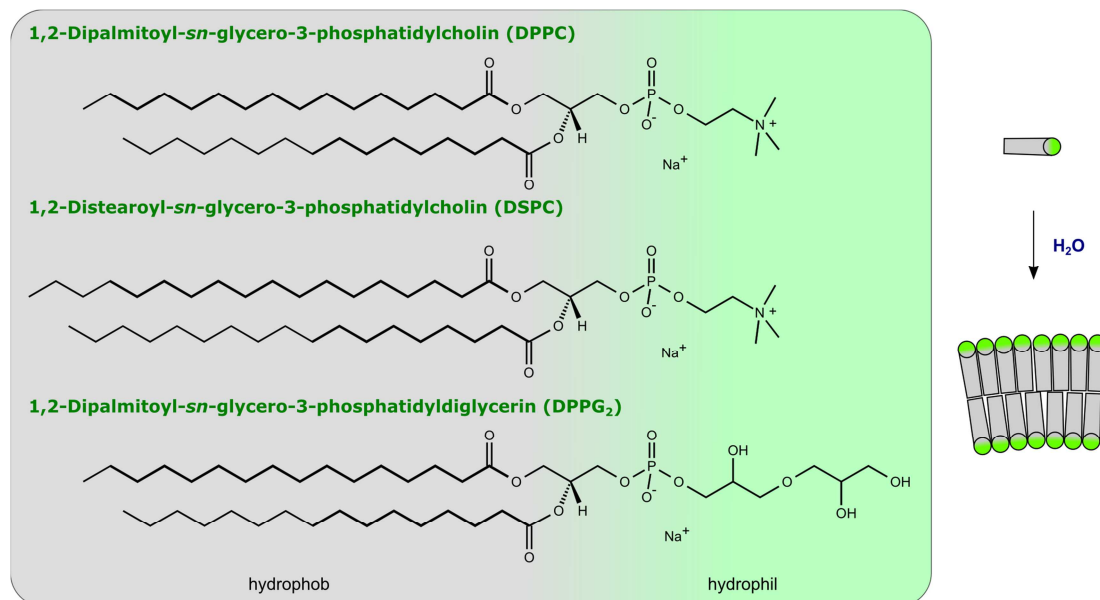


Abbildung 4 – Chemische Struktur der Phospholipide DPPC, DSPC und DPPG₂ und die Bildung lamellarer Strukturen von Phospholipiden in wässriger Lösung

2.2 Wirkstoffe

2.2.1 Doxorubicin

Dox ist ein Wirkstoff aus der Gruppe der Anthrazyklin-Antibiotika. Es wurde in den 1970er Jahren erstmals aus *Streptomyces peucetius subspecies caesius* isoliert [18]. Dox hat fluoreszierende Eigenschaften, die zur Detektion des Wirkstoffes genutzt werden können.

Dem Wirkstoff wird eine Reihe von Wirkungsmechanismen zugeschrieben. Dazu gehören zum einen die Inhibition der Deoxyribonukleinsäure-Synthese (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) und der DNA-Polymeraseaktivität durch Interkalierung des Anthrazyklinrings in die DNA [19] und zum anderen Einzel- und Doppelstrangbrüche, die durch Behinderung der Topoisomerase II entstehen [19]. Im Nukleus bindet Dox kovalent Topoisomerase II und verhindert so die Dekondensation der Doppelhelix [20]. Dies sind die beiden Hauptmechanismen der zytotoxischen Wirkungsweise von Dox. Außerdem wirkt Dox aufgrund der Quinonstruktur als Elektronenakzeptor in Reaktionen mit Oxidoreduktasen [19]. Dabei werden freie Radikale gebildet (Superoxide, Hydroxylradikale, Peroxide). Auch durch Komplexbildung mit Eisen entstehen freie Radikale. Die Bildung dieser Radikale führt wiederum zu oxidativem Stress. Das hat Lipidperoxidation, Membran- und DNA-Schäden zur Folge [18]. Des Weiteren kann es zu kovalenten DNA-Quervernetzungen (engl. *crosslinks*), Beeinträchtigung der Helicase und Wachstumsarrest der Zelle kommen [19].

Neben der Myelosuppression ist die kumulative Kardiotoxizität die Hauptnebenwirkung von Dox. Für die Entstehung von chronischer Kardiomyopathie und kongestiver Herzinsuffizienz werden die freien Radikale und mitochondriale Störungen verantwortlich gemacht [18].

Dox wird bei einer Vielzahl von Karzinomen, Hämoblastosen, Blastomen und Sarkomen eingesetzt [21]. Sowohl das Weichteilsarkom als auch das Blasen-

karzinom (systemisch und intravesikal) gehören zum Anwendungsgebiet dieses Wirkstoffs.

2.2.2 Gemcitabin

Gemcitabin (2',2'-Difluordeoxycytidin, Gem) ist ein Analogon der Pyrimidinbase Cytidin. Es unterscheidet sich von der Base durch Fluorsubstitutionen an Position 2' des Furanoserings [22].

Über Natrium-abhängige, konzentrationsgesteuerte (engl. *human concentrative nucleoside transporter, hCNT*) oder Natrium-unabhängige, equilibriumgesteuerte Nukleosid-Transporter (engl. *human equilibrative nucleoside transporter, hENT*) gelangt Gem in die Zelle [23]. Das hydrophile Gem kann nicht selbstständig durch Zellmembran diffundieren und ist somit von der Aktivität der Transporter abhängig. Bei Gem handelt es sich um eine sogenannte Prodrug, die in der Zelle durch die Deoxycytidinkinase sowie in geringem Umfang auch von der Thymidinkinase 2 in die aktiven Metabolite Gemcitabinmonophosphat, -diphosphat und -triphosphat umgewandelt wird [23]. Gemcitabintriphosphat gilt als der wichtigste aktive Metabolit. Er wird von der DNA-Polymerase statt Deoxycytidin in die DNA inkorporiert. Es kommt zur Inhibition der DNA-Polymerase und schließlich zum Einzelstrangbruch [23]. Gemcitabinmonophosphat besetzt die terminale Position des DNA-Strangs und blockiert damit die Reparaturfunktion der DNA-Polymerase [24]. Gemcitabindiphosphat inhibiert die Ribonukleotid-reduktase und behindert die DNA-Synthese somit durch Reduzierung von Deoxynukleosidtriphosphat. Hauptsächlich inaktiviert Deoxycytidin-Deaminase die Metaboliten durch Überführung derselben in das unwirksame Difluordeoxyuridin [23]. Aber auch die Deaminierung von Gemcitabinmonophosphat zu Difluordeoxyuridinmonophosphat und die Rückumwandlung durch die 5'-Nukleotidase von Gemcitabinmonophosphat zu Gem spielen eine Rolle bei der Wirkstoffinaktivierung.

Nebenwirkungen sind Myelosuppression und Toxizitäten in Lungen, Leber und Nieren. Klinisch wird Gem allein, oder als Kombinationstherapie beim

Mamma-, Harnblasen-, Pankreas-, Ovarial- und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom eingesetzt [25].

2.2.3 Mitomycin C

Mitomycin C (Mito) ist ein zytostatisches Antibiotikum, das 1958 aus *Streptomyces caespitosus* isoliert wurde [26]. Zuvor wurden Mitomycin A und B entdeckt. Auch sie zeigten antibakterielle und antineoplastische Eigenschaften, aber in geringerem Umfang verglichen mit Mito [27].

Mito liegt in inaktiver Form vor und hat drei potentiell aktive Gruppen, die Chinon-, die Urethan- und die Aziridingruppe [27]. Durch Reduktion des Chinons und anschließenden Verlust der Methoxygruppe erfolgt die Aktivierung. Mito wirkt über Alkylierung der komplementären DNA-Stränge (engl. *crosslinks*) mit entsprechender Hemmung der DNA-Synthese [28]. Außerdem werden bei der Reduktion des Chinons durch eine Kaskade spontaner Transformationen reaktive Sauerstoffspezies gebildet, die oxidativen Zellstress zur Folge haben [29]. Die freien Sauerstoffradikale werden für das Auftreten von Nebenwirkungen verantwortlich gemacht (Myelosuppression, Toxizitäten in Lungen und Nieren).

Bedeutung hat Mito bei der Therapie von Kolorektal-, Leberzell-, Magen-, Ösophagus-, Zervix-, Bronchial- und Pankreaskarzinomen sowie bei Kopf-Hals-Tumoren. Intravesikal wird es zur Rezidivprophylaxe nach transurethraler Resektion (TUR) von Harnblasenkarzinomen eingesetzt [30].

2.3 Hyperthermie

Der Begriff regionale HT beschreibt ein Verfahren, bei dem Gewebe über einen längeren Zeitraum auf Temperaturen über der physiologischen Körpertemperatur (40–43 °C, ~60 min) erwärmt wird, um eine moderate Änderung der Gewebe- und Zellphysiologie zu erreichen [3, 31]. Abzugrenzen sind diese Therapieansätze wiederum von der nicht lokalen

Ganzkörper-HT mit Temperaturen von $\sim 39\text{ }^{\circ}\text{C}$ [32], bzw. thermoablative Verfahren mit Temperaturen $> 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit dem Ziel des direkten Abtötens von Tumorzellen [33].

Die Erwärmung der Zielareale kann durch verschiedene Methoden erreicht werden. Im klinischen Betrieb findet die regionale Tiefen-HT mit um den Körper angeordneten Mikrowellenantennen Anwendung [3]. In klinischen Studien oder in Tierexperimenten wird Gewebe außerdem auch über Ultraschall zusammen mit Ultraschalltransducern [34] [35] [36], mit Wärmelampen [37] [38] oder im Wasserbad erwärmt [39].

Tumoren haben eine chaotische Vaskularisation. Aufgrund von Minderdurchblutung einzelner Tumorareale kommt es zu veränderten physiologischen Gegebenheiten wie Hypoxie und niedrigen pH-Werten. Dies macht Tumorzellen gegenüber Temperaturerhöhung sensibler im Vergleich mit gesundem Gewebe [40]. Dadurch kommt es bei Erwärmung zur selektiven Zellzerstörung dieser hypoxischen, sauren Tumorareale. Durch die Ausbildung von Hitzeschockproteinen (engl. *heat shock proteins*, HSP), die Zellen eigentlich bei Hitzestress schützen und die für die Entwicklung von Thermotoleranzen verantwortlich gemacht werden, können auch immunmodulatorische Effekte eingeleitet werden [41]. Als HSP-Peptid-Komplexe können sie Tumorantigene auf der Zelloberfläche präsentieren, die von T-Zellen attackiert werden [42]. Außerdem führt HT zur Erhöhung der Membranpermeabilität, strukturellen Änderungen am Zytoskelett, Veränderungen der Organisation der Zentrosomen und des Spindelapparates, Inhibition von DNA-Reparaturmechanismen und zur Einleitung von apoptotischen Signalwegen [41]. Insgesamt zeigt eine Monotherapie mit HT allerdings keine zufriedenstellenden Ergebnisse in der Krebstherapie.

Heutzutage wird HT eingesetzt, um die Effizienz von Standardmethoden in der Krebstherapie zu steigern. Zellen in hypoxischen, sauren Tumorarealen oder auch Zellen in der S-Phase des Zellzyklus gelten als bestrahlungsresistent [32]. Bei Kombination von HT und Strahlentherapie wird aufgrund von HT induzierter Oxygenierung das Gewebe für die Therapie sensitiviert

[40]. Bei der Strahlentherapie entstehen DNA-Schäden. HT hat aufgrund von Hemmung von DNA-Reparaturmechanismen potenzierend Wirkung in Kombination mit Bestrahlung. Durch HT gesteigerter Blutfluss und Perfusionrate, sowie erhöhter Gefäßinnendruck mit Erweiterung der Poren von Endothelzellen, erhöhen die Wirkstoffanreicherung im Tumorgewebe bei Kombination mit konventioneller Chemotherapie [33]. Die effizientere Wirkung durch das Zusammenspiel von HT und Chemotherapie, konnte bereits einen signifikanten Vorteil bei der Therapie des Weichteilsarkoms zeigen [3]. Außerdem ergibt sich bei einer kombinierte Behandlung mit HT bei einer Reihe von Zytostatika eine gesteigerte Wirksamkeit [40]. HT spielt neuerdings auch eine Rolle, um Tumorresistenzen gegenüber Chemotherapeutika zu überwinden [43].

Thermostabile Nanopartikel als Wirkstoffträgersysteme können durch eine Verlängerung der Zirkulationszeit der Zytostatika die passive Anreicherung im Tumorgewebe erhöhen. Die Gewebeerwärmung führt zu einer erleichterten Extravasation und somit zu einer Steigerung der Akkumulation im Tumorgewebe [33].

Die Behandlung mit TSL in Kombination mit HT profitiert von allen HT-Effekten bei gleichzeitiger wärmeinduzierter, zielgerichteter Wirkstofffreisetzung. Hohe Stabilität bei Körpertemperatur und schnelle Freisetzung (engl. *burst release*) im erwärmten Zielgewebe führen dort zu hohen intravaskulären Wirkstoffkonzentrationen über die gesamte Behandlungsdauer. Die konstant hohen intravaskulären Konzentrationen erhöhen die Eindringtiefe und verhindern die Auswaschung aus dem Gewebe [44]. Dadurch kommt es zu gesteigerter Akkumulation in den Zellen.

2.4 Das Blasenkarzinom

Harnblasenkarzinome lassen sich in oberflächliche, sich auf das Urothel und die *Lamina propria* beschränkende (TNM-Stadien pTa, pTis, pT1) und muskelinvasive, über die *Lamina propria* hinaus in die *Tunica muscularis* wachsende (TNM-Stadium T2-4) Karzinome unterteilen. 70-80% der Blasenkarzinome sind oberflächliche Tumoren [45]. Aufgrund der anatomischen Gegebenheiten ist die Harnblase für eine lokale Behandlung zugänglich. Durch transurethrale Resektion (TUR) kann Tumorgewebe entfernt werden. Trotz erfolgreicher chirurgischer Exzision haben mäßig oder schlecht differenzierte superfizielle Blasenkarzinome (G2-G3) eine Rezidivrate von 90%. Deshalb ist in diesen Fällen im Anschluss an die Entfernung eine regionale, intravesikale Behandlung indiziert [45]. Dabei handelt es sich entweder um eine intravesikale Immuntherapie mit *Bacillus Calmette-Guérin* oder eine intravesikale Chemotherapie. Dox, Mito oder Epirubicin sind standardmäßig verwendete Chemotherapeutika für die Zytostatikainstallation in der Blase. Trotz adjuvanter Therapie kommt es zur Bildung von Rezidiven. Bei der intravesikalen Behandlung werden nur in oberflächliche Blasenschichten therapeutische Wirkstoffkonzentrationen erreicht. Verbliebene Tumorzellen in tieferen Schichten führen häufig zur Bildung von höhergradigen Rezidiven. Rezidive und muskelinvasive Tumoren werden durch eine radikale Zystektomie behandelt. Dieser invasive Eingriff stellt für die Patienten eine enorme psychische und physische Belastung dar.

Um die Therapie des Blasenkarzinoms zu verbessern, wird versucht, mit bioadhäsiven Trägersystemen, permeabilitätssteigernden Medikamenten oder auch mittels einer Kombination aus Chemotherapie und HT die Penetration und Akkumulation der Wirkstoffe bei intravesikaler Therapie zu erhöhen [45].

2.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit soll die Entwicklung und Optimierung eines wärmeinduzierbaren Transfersystems für den zielgerichteten Transport und die spezifische Freisetzung verschiedener therapeutisch wirksamer Substanzen in soliden Tumoren sein. Die verwendete TSL-Formulierung erlangt ihre Spezifität durch das selektive Erwärmen von Tumorgewebe. Dadurch sollen die Therapieeffizienz gesteigert und schädliche Nebenwirkungen reduziert werden.

Die Wirksamkeit von TSL(Dox) wurde bereits *in vitro* und *in vivo* am subkutanen (s.c.) BN175 Weichteilsarkom der Ratte untersucht [16]. Es konnten deutliche Vorteile gegenüber nicht liposomalem Dox, lang-zirkulierendem Caelyx® und thermosensitivem Thermodoxanalogon gezeigt werden [16]. Der Einschluss weiterer Wirkstoffe kann Vorteile in der Therapie eines breiten Spektrums solider Tumorerkrankungen bringen. Neben Dox sind Gem und Mito bei Standardchemotherapien eingesetzte Wirkstoffe, mit vielversprechenden antineoplastischen Eigenschaften. Eine kurze Zirkulationszeit und geringe Anreicherung im Tumorgewebe schränken die Wirksamkeit jedoch stark ein. Der liposomale Einschluss und die zielgerichtete Freisetzung dieser Wirkstoffe sollen in dieser Arbeit *in vitro* und in verschiedenen Tumormodellen *in vivo* untersucht werden.

In Zellkulturexperimenten wird die Empfindlichkeit von Dox, Gem und Mito auf unterschiedliche Tumorzelllinien getestet. Daraus kann im Folgenden eine Wirkstoffeignung für Therapieversuche *in vivo* abgeleitet werden. Erstmals soll Mito in die hier bearbeitete DPPG₂-TSL Formulierung eingeschlossen werden. Die TSL mit eingeschlossenem Mito (TSL(Mito)) sollen vollständig charakterisiert und ihre Stabilität *in vitro* und *in vivo* getestet werden.

Die Stabilität bei Mehrfachinjektionen und dosisabhängige Änderungen der Zirkulationszeit der TSL(Dox) sollen in Pharmakokinetikstudien untersucht werden. Diese Informationen sind für den Einsatz am Menschen von großer

Bedeutung, da Tumorthapien klinisch mehrfache Behandlungen mit maximaler Effizienz erfordern.

Außerdem soll ein Blasenkarzinom-Modell in der Ratte mit einer neuartigen lokalen Erwärmungsmethode etabliert werden. Dies soll neue Ansätze in der Therapie dieser Tumorerkrankung bieten. Hauptgegenstand soll dabei eine Anreicherungsstudie sein. Die Wirkstoffverteilung in den Blasenschichten und in anderen Organen bei intravesikaler und systemischer Behandlung soll miteinander verglichen werden. Es wird untersucht, ob die systemische, zielgerichtete Behandlung mit TSL(Dox) in Kombination mit HT die Wirkstoffakkumulation in den tiefen Blasenschichten steigert. Dabei werden die fluoreszierenden Eigenschaften der bewährten TSL(Dox) und ihre Nachweisbarkeit im Gewebe ausgenutzt.

Die Therapieeffizienz der bereits charakterisierten TSL mit eingeschlossenem Gem (TSL(Gem)) soll erstmals im bereits etablierten s.c. Weichteilsarkom-Modell eingesetzt werden, um den Vorteil der zielgerichteten Freisetzung dieser Formulierung zu untersuchen. Vorab werden auch die TSL(Gem) auf ihre Stabilität *in vivo* getestet.

3 Material

3.1 Liposomen

3.1.1 Lipide

Lipide	Chemische Formel	Abkürzung	Bezugsquelle
1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	$C_{40}H_{80}NO_8P$	DPPC	Corden Pharma Switzerland LLC
1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy-amino(polyethylen-glycol)-2000]	$C_{139}H_{271}N_4O_{57}P$	DSPE-PEG ₂₀₀₀	Avanti Polar Lipids Alabaster, Alabama, USA
1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerodiglycerin	$C_{41}H_{81}O_{12}P$	DPPG ₂	Corden Pharma Switzerland LLC
1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	$C_{44}H_{88}NO_8P$	DSPC	Corden Pharma Switzerland LLC
1-Palmitoyl-2-hydroxy- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	$C_{24}H_{50}O_7N$	P-Lyso-PC	Corden Pharma Switzerland LLC

Tabelle 2 - Übersicht Lipide für die Herstellung von Liposomen

3.1.2 Zytostatika

Bezeichnung	Wirkstoff	Konzentration	Bezugsquelle
Adrimedac [®] / Doxorubicin Accord [®]	Dox	2 mg/ml	Bendalis GMBH/ medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Oberhaching, D
Gemzar [®] Mitomycin medac [®]	Gem Mito	38 mg/ml 1 mg/ml	Lilly Deutschland GMBH medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Bad Homburg, D
Caelyx [®]	Dox	2 mg/ml	Essex Pharma GmbH, München, D

Tabelle 3 - Übersicht Zytostatika

3.2 Zellkultur

3.2.1 Zelllinien

Bezeichnung	Tumormodell	Tiermodell	Bezugsquelle
AY27	Blasenkarzinom	Syngen F344 Ratte	Prof S. Seleman, Universität von Toledo, Ohio, USA
BN175	Weichteilsarkom	Syngen BN175 Ratte	Dr. T. ten Hagen, Erasmus MC, Rotterdam, NL
DHD/K12/TRb	Kolonkarzinom	Syngen BD-IX Ratte	ECACC, UK

Tabelle 4 - Übersicht Zelllinien

AY27

Die Zelllinie AY27, ein Urothelzellkarzinom, wächst syngen in Fischer F344/DuCrI Ratten (F344) und ist hinsichtlich ihres Wachstums- und Progressionsverhaltens mit Urothelkarzinomen des Menschen vergleichbar. Die Primärkultur stammt von einem Tumor, der durch kontinuierliche N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide Fütterung in männlichen Fischer F344

Ratten induziert wurde. Die Zelllinie etablierte sich zuerst durch s.c. Transplantation mit anschließender Aufrechterhaltung als Kultur [46].

BN175

Das Weichteilsarkom BN175 ist ein nichtimmunogener Tumor, der nach s.c. Tumorzellinjektion bzw. Tumorfragmentimplantation syngen in Brown Norway BN/Crl Ratten (BN) wächst. 1983 wurde ein spontan wachsendes Liposarkom LS175 im Retroperitonealraum einer weiblichen Brown Norway Ratte beschrieben [47]. Eine Woche nach s.c. Tumorstücktransplantation war ein Tumorwachstum palpatorisch erkennbar. 1984 beschreibt Kort ein schnell wachsendes, metastasierendes, transplantierbares Fibrosarkom BN175 [48]. Heute wird der Tumor als Weichteilsarkom BN175 bezeichnet [49],[50].

DHD/K12/TRb

Die Rattentumorzelllinie DHD/K12/TRb ist ein in BD-IX Ratten syngen wachsendes Kolonkarzinom. Es ist ein übertragbares Karzinom das durch 1,2 Dimethylhydralazin induziert wird [51]. In dieser Arbeit wurde diese Zelllinie ausschließlich in *in-vitro*-Versuchen verwendet.

3.3 Tierversuche

3.3.1 Versuchstiere

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
Brown Norway BN/Crl Ratte	Weichteilsarkom BN175	Charles River Laboratories, Sulzfeld, D
Fischer F344/DuCrI Ratte	Blasenkarzinom AY27	Charles River Laboratories, Sulzfeld, D

Tabelle 5 - Übersicht Versuchstiere

Brown Norway BN/Crl Ratten

Der Wildtyp eines 1930 in Gefangenschaft genommenen Rattenstammes wurde von King und Aptekman gezüchtet. Aus diesem Stamm begannen Silvers und Billingham 1958 mit der Züchtung der braun mutierten Inzuchtlinie. Seit 1976 ist der Stamm BN/Crl bei Charles River erhältlich (persönliche Mitteilung von Charles River Laboratories).

Fischer F344/DuCrl Ratten

Die F344 Inzuchtrattenlinie stammt aus einer Verpaarung von #344 Ratten eines New Yorker Züchters namens Fischer. Die Kolonie entstand bei M. R. Curtis, welcher am Columbia University Institute of Cancer Research tätig war. Dunning etablierte den Stamm 1920 als Inzuchtstamm. Von diesem ursprünglichen Stamm gehen alle Unterlinien hervor, auch die F344/DuCrl, vormals auch CDF(F344)/CrlBR oder einfach CDF genannt. Dieser Stamm wurde von Charles River direkt von Dunning 1960 bezogen. Seit 1996 ist dieser Stamm nicht mehr nur von Charles River USA erhältlich, sondern auch in Deutschland (persönliche Mitteilung von Charles River Laboratories).

Angaben zu weiteren Materialien befinden sich im Anhang (siehe 10.1 Materialien).

4 Methoden

4.1 Liposomen

4.1.1 Liposomenherstellung

Die Liposomen wurden nach der Filmhydratations- und Extrusionsmethode hergestellt [52].

Lipidfilm

Die Lipide wurden in Pulverform bei +4 °C gelagert. Um eine Gewichtsverfälschung durch Wasserkondensation zu vermeiden, wurden sie vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht. Die mit der Feinwaage einzeln abgewogenen Lipide wurden in Chloroform bzw. Chloroform/Methanol 9:1 (vol/vol) gelöst. Die entsprechende Menge der Lipide wurde in einen Glasrundkolben überführt und vermischt. Durch Entfernung des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer entstand ein homogener Lipidfilm. Eine Lagerung ist unter Lichtabschluss im Vakuum möglich.

Hydratisierung

Bei der ebenfalls im Rotationsverdampfer stattfindenden Hydratisierung entstanden nach Zugabe des gewünschten Puffers multilamellare Lipidvesikel.

Extrusion

Durch N₂-Gasdruckextrusion wurden die multilamellaren Vesikel in zehn aufeinanderfolgenden Durchgängen durch zwei Polycarbonatfilter (Porengröße 100 bzw. 200 nm) extrudiert. Durch Anschluss des Extruders an ein Wasserbad wurde die Temperatur der Dispersion konstant auf 60 °C gehalten, wodurch die Liposomenmembran in die flüssigkristalline Phase

gebracht wurde. Dadurch wurde der Extrusionsvorgang erleichtert. Die nach der Extrusion entstandene Liposomenlösung mit unilamellaren Vesikeln wurde nach dem Abkühlen auf + 4 °C sofort weiterverarbeitet oder aliquotiert und bei – 20 °C gelagert.

Umpufferung von Citratliposomen

Bei Lipidfilmen, die mit Citratpuffer (300 mM) pH 4 hydratisiert wurden, wurde mittels Gelfiltration der saure extravasikulare Citratpuffer gegen Hepes-Kochsalz Puffer (HN-Puffer) pH 7,4 getauscht. In Pasteur-Glaspipetten gegossene Sephadex[®]-Säulen wurden mit Puffer equilibriert, bevor die Liposomenlösung auf die Säulen gegeben wurde. Als Eluent diente HN-Puffer pH 7,4. Die resultierende liposomenhaltige Lösung wies einen transmembranen pH-Gradienten zwischen dem intravesikulären Raum (pH 4) und dem extravasikulären Raum (pH 7,4) auf.

4.1.2 Wirkstoffeinschluss

Bei der Beladung von Liposomen unterscheidet man zwischen einem aktiven und einem passiven Einschluss. Beim aktiven Wirkstoffeinschluss gelangt ein ungeladenes Molekül aufgrund eines transmembranären pH-Gradienten über Diffusion in das Innere des Vesikels. Dort wird durch Protonierung der Wiederaustritt verhindert (Protonenfalle).

Beim passiven Wirkstoffeinschluss kann der Wirkstoff bei der Hydratisierung des Lipidfilms zugesetzt werden. Bei der Vesikelbildung wird spontan Wirkstoff eingeschlossen. Ein passiver Einschluss kann auch durch Zugabe von Wirkstoff zu vorgefertigten Liposomen mit anschließender Inkubation bei Temperaturen über der Phasenumwandlungstemperatur stattfinden. Durch die temperaturabhängige Strukturänderung der Membran kann sich der Wirkstoff gleichmäßig intra- und extravasikulär verteilen.

Aktiver Wirkstoffeinschluss mit Dox

Doxorubicin liegt als schwache Base außerhalb des Liposoms vor und wurde aktiv in die Liposomen eingeschlossen [17]. Ein Testeinschluss war notwendig, um die Bedingungen für die Beladung zu optimieren (Temperatur, Wirkstoff:Lipid-Verhältniss). Dieser wurde vor dem eigentlichen Einschluss auf die gleiche Weise nur mit einem kleinen Teil der hergestellten Liposomen durchgeführt. Die Dox-Stammlösung und die mit HN-Puffer pH 7,8 verdünnte Citratliposomenlösung wurden im Thermomixer bei 38 °C vorinkubiert. Die zuvor berechnete Menge Dox-Stammlösung wurde zu den Liposomen pipettiert. Zu den Zeitpunkten 0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 45 min und 60 min wurde die Fluoreszenz im Spektrofluorometer (Anregungswellenlänge 470 nm, Emissionswellenlänge 555 nm) gemessen. Die Fluoreszenzintensität nahm mit Fortschreiten des Einschlusses ab. Der Einschluss war abgeschlossen, wenn der Wert < 10-15% des Ausgangswertes (Zeitpunkt 0 min) betrug. Nach Abkühlung auf 4°C wurden die TSL(Dox) abzentrifugiert (60 min, 57.750xg, 15 °C). Der Überstand mit dem darin verbliebenen nicht liposomalen Dox wurde abgenommen und das Pellet mit HN-Puffer pH 7,4 (2/3 der Ausgangsmenge) resuspendiert.

Passiver Wirkstoffeinschluss mit Gem und Mito

Um eine möglichst sichere Handhabung zu gewährleisten und eine Kontamination der Geräte zu vermeiden, wurde Gem/Mito in vorgefertigte Liposomen eingeschlossen [37]. Die Durchführbarkeit eines passiven Einschlusses wurde bereits für andere Liposomenformulierungen [53] bzw. Wirkstoffe [54] gezeigt. Nach der Hydratisierung des Lipidfilms für Gem Liposomen bzw. Mito Liposomen mit HN-Puffer pH 7,4 bzw. physiologischer Kochsalzlösung pH 7,5 folgte die Extrusion. Anschließend wurde die Liposomendispersion 1:1 (vol/vol) mit Gemzar® bzw. Mitomycin medac® (Gem 38 mg/kg, Mito 1 mg/ml) verdünnt und für 30 min bei 60 °C im Thermomixer inkubiert. Nach Abkühlen auf 4 °C wurden die Liposomen durch Zentrifugation (60 min, 57.750xg) und anschließende Resuspension mit HN-Puffer pH 7,4 konzentriert. Durch Gelfiltration mit HN-Puffer pH 7,4 wurde nicht eingeschlossener Wirkstoff entfernt.

4.1.3 Liposomencharakterisierung

Liposomengröße, Polidispersionsindex und ζ -Potential

Die Brownsche Molekularbewegung besagt, dass sich Partikel in einer Dispersion, abhängig von ihrer Größe, unterschiedlich schnell bewegen. Ein Laser erzeugt Streulicht, welches zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen wird. Durch die Partikelbewegung wird das Licht unterbrochen. Anhand der unterschiedlichen Positionen wird die Geschwindigkeit der Teilchen ermittelt. Dies gibt Aufschluss über die Liposomengröße und die Größenverteilung (Polydispersionsindex, PDI).

An der Abscherschicht der geladenen Liposomen und deren Umgebung herrscht ein elektrisches Potential (ζ -Potential). Anhand der gemessenen Partikelgeschwindigkeit beim Anlegen eines elektrischen Feldes kann das elektrische Potential errechnet werden. Mit Hilfe des ζ -Potentials kann eine Aussage über die Neigung zur Aggregatbildung der Vesikel getroffen werden.

Für die Messung im Zetasizer Nano ZS wurde die Liposomenlösung 1:50 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und bei 25 °C gemessen.

Quantifizierung des Lipidgehalts, Phosphatbestimmung

Da jedes Phospholipid ein Phosphoratom besitzt, ist die molare Phosphatmenge der molaren Phospholipidmenge gleich zu setzen. Mit Schwefelsäure und Perchlorsäure wurden die Phospholipide in anorganisches Phosphat überführt (Heizblock 300 °C). Nach Zugabe von Ammoniumheptamolybdat bildete das Phosphat Komplexe mit Molybdän. Eine Fällung mit Triton X-100 (Octylphenolpolyethylenglykoether) führte zu einer phosphatkonzentrationsabhängigen Trübung, die photometrisch gemessen werden konnte. Diese Methode wurde von Eibl et al. entwickelt und publiziert [55].

Phospholipidanalyse

Die Lipidzusammensetzung und das Auftreten unerwünschter Lysolipide in einer Liposomenformulierung können mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie untersucht werden [52]. Nach Zugabe von Chloroform/Methanol (3:1) und Zentrifugation wurde die flüssige von der organischen Phase getrennt. Durch Eindampfen des Lösungsmittels unter N₂-Begasung (Heizblock 40 °C) und erneutem Lösen der Probe in Chloroform/Methanol 9:1 (vol/vol) wurde eine 20 mM Lipidlösung hergestellt. Die Probe wurde auf eine Kieselgel 60 Dünnschichtchromatographie (DC) Platte aufgetragen (stationäre Phase) und in das Laufmittel (mobile Phase) zur Auftrennung von Lysolipiden, Phosphatidylcholinen und -glycerinen gestellt. Durch Wechselwirkungen mit der flüssigen bzw. der festen Phase wandern die unterschiedlichen Bestandteile der Proben durch Kapillarkräfte unterschiedlich weit nach oben. Nach einer selektiven Färbung der Phospholipide mit Molybdänblauspray konnten die Bestandteile anhand der zurückgelegten Distanz identifiziert werden.

4.1.4 Konzentrationsbestimmung in Liposomen

Doxorubicinkonzentration

Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften des Doxorubicins kann nach der Zerstörung der Liposomen die Konzentration des zuvor eingeschlossenen Wirkstoffs mittels Fluoreszenzspektroskopie gemessen werden. Nach Verdünnung mit HN Puffer pH 7,4 wurde die Probe mit Triton X-100 versetzt und bei 45 °C für 15 min inkubiert. Dies führte zur Freisetzung des gesamten Doxorubicins aus den Liposomen. Die mit Messpuffer verdünnte Probe wurde bei einer Wellenlänge von 470 nm angeregt und bei einer Emissionswellenlänge von 555 nm im Fluoreszenzspektrometer gemessen. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde Adriamycin[®] verwendet. Caelyx[®] wurde als Doxorubicin-Standard herangezogen.

Gemcitabin- und Mitomycin C-Konzentration

Da Gem und Mito im Gegensatz zu Dox keine Eigenfluoreszenz aufweisen, wurde ihre Konzentration mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) bestimmt. Die Zugabe von Acetonitril zerstörte die Liposomen und setzte den eingeschlossenen Wirkstoff frei.

Nach Zentrifugation und Eindampfen mittels N₂-Begasung wurde der Rückstand mit HPLC-Laufmittel (10 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH 7 bzw. 30% Acetonitril, mobile Phase) resuspendiert. Anschließend wurde die Probe auf eine C18 Säule (stationäre Phase) geschickt. Durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen der Bestandteile verbleiben diese verschieden lange auf der Säule. Wann und in welchem Ausmaß das Gem die Säule verlässt, wurde mit Hilfe eines UV-Detektors gemessen. Genauere Angaben zur Konzentrationsbestimmung mittels HPLC unter 4.4.

(A) TSL(Gem)

Bezeichnung	c _{Lipid} (mM)	c _{Wirkstoff} (mM)	Wirkstoff/Lipid Verhältnis (mol/mol)	ζ (mV)	Vesikel- größe (nm)	PDI	DC	
							DPPG ₂ (%)	Lyso-PC (%)
[24/02G]	13,7	2,2	0,16	-21,1	135	0,14	26,1	2,8
[23/31G]	34,2	4,0	0,12	-22,9	174	0,16	25,7	0,0
[23/29G]	36,6	5,0	0,14	-23,9	184	0,16	28,4	2,7
[21/18G]	16,5	2,9	0,18	-22,2	128	0,06	31,9	1,5
[21/14G]	19,2	3,1	0,16	-23,5	142	0,06	31,5	1,8
[21/07G]	13,9	1,7	0,12	-23,6	148	0,05	31,4	1,3
[21/02G]	15,6	1,8	0,11	-27,0	134	0,11	36,0	3,4
MW	21,4	3,0	0,14	-23,5	149	0,11	30,1	1,9
SA	9,8	1,2	0,03	1,8	21	0,05	3,7	1,1

(B) TSL(Dox)

Bezeichnung	c _{Lipid} (mM)	c _{Wirkstoff} (mM)	Wirkstoff/Lipid Verhältnis (mol/mol)	ζ (mV)	Vesikel- größe (nm)	PDI	DC	
							DPPG ₂ (%)	Lyso-PC (%)
[22/03D]	24,1	4,3	0,18	-28,6	118	0,09	31,80	0,0
[23/02D]	24,4	3,9	0,16	-28,6	118	0,09	33,9	1,7
[23/27D]	30,1	3,8	0,13	-25,9	122	0,10	14,5	0,0
MW	26,2	4,0	0,15	-27,7	119	0	26,7	0,6
SA	3,4	0,2	0,02	1,6	2	0	10,6	1,0

Tabelle 6 - Charakterisierung von Liposomen A TSL(Gem), B TSL(Dox); c_{Lipid} =

Lipidkonzentration, c_{Wirkstoff} = Wirkstoffkonzentration, **Wirkstoff/Lipid** = Wirkstoff zu Lipid Verhältnis, ζ = ζ-Potential, **Vesikelgröße** = Liposomengröße, **PDI** = Polydispersionsindex, DC = Dünnschichtchromatographie

4.1.5 Temperaturabhängige Mitomycin C-Freisetzung

Bei der Erstellung des Temperaturprofils wurde *in vitro* die Menge des freigesetzten Wirkstoffes bei Temperaturen zwischen 37 °C und 45 °C gemessen [37]. Somit konnte eine Aussage über die Liposomenstabilität getroffen werden.

TSL(Mito) wurden 1:12 (vol/vol) mit HN-Puffer pH 7,4 oder fetalem Kälberserum (engl. fetal calf serum, FCS) verdünnt. Anschließend wurden jeweils 120 µl der Proben für 5 min bei 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C und 45 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit kaltem HN-Puffer pH 7,4 unterbrochen und die Probe in Millipore Amicon® Ultra-0,5-Filtereinheiten (30 kDa) zentrifugiert (14.000 g, 10 min). Das freigesetzte Mito gelangte ins Filtrat und konnte mit HPLC, wie unter 4.4 beschrieben, gemessen werden.

$$R_T(\%) = \frac{c_T - c_{0\%}}{c_{100\%} - c_{0\%}} \cdot 100$$

R_T	temperaturabhängig freigesetztes Mito
c_T	nicht liposomales Mito nach 5 min Inkubation bei der Temperatur T
$c_{0\%}$	nicht liposomales Mito ohne Inkubation
$c_{100\%}$	mit Triton X-100 zerstörte Liposomen mit anschließender Inkubation bei 45°C für 15 min

4.2 Zellkultur

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, einer Atmosphäre von 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95% in 75 cm² Zellkulturflaschen inkubiert. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter der Sterilwerkbank.

4.2.1 Zellkultivierung

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um permanente Zelllinien, die adhärent wachsen. Dem jeweiligen Kulturmedium wurde stets 10% FCS sowie 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin zugesetzt.

Zelllinie	Kulturmedium
AY27	RPMI 1640 Medium, NaHCO ₃ gepuffert, mit stabilem Glutamin
BN175	RPMI 1640 Medium, NaHCO ₃ gepuffert, mit stabilem Glutamin
DHD//K12/TRb	Dulbecco's MEM; NaHCO ₃ gepuffert, mit stabilem Glutamin/ Ham's F10, ohne NaHCO ₃ , mit stabilem Glutamin (1:2)

Tabelle 7 - Bedingungen Zellkultivierung

4.2.2 Passagieren der Zellen

Die verwendeten, schnell wachsenden Tumorzelllinien wurden alle drei bis vier Tage passagiert. Nach Abnahme des Kulturmediums wurden die Zellen zweimal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) gewaschen. Um die Zellen abzulösen, wurden sie für einige Minuten mit Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Lösung bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion des Trypsin/EDTA durch Zugabe von frischem Medium abgestoppt. Durch mehrfaches Pipettieren der Zellsuspension wurden die Zellen weiter vereinzelt. Mittels schonender

Zentrifugation und Absaugen des Überstands wurde das Trypsin/EDTA entfernt. Die Zellen wurden in frisches Medium aufgenommen und 1:10 (vol/vol) verdünnt ausgesät.

	AY27	BN175	DHD/K12/TRb
Trypsin/EDTA	0,25 % 7-10 ml	0,05 %ig 2-3 ml	0,25 %ig 7-10 ml
Inkubations- dauer	7-10 min	2-4 min	7-10 min
Medium- zugabe	13 ml	8-10 ml	13 ml
Zentrifugation	7-10 min 25 °C 1400 r/min	2-3 min 25 °C 1500 r/min	5-7 min 25 °C 700-1000 r/min

Tabelle 8 - Passagieren der Zellen

4.2.3 Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer Zählkammer

Um eine definierte Menge an Zellen in einem gewünschten Volumen zu erhalten, wurde die Zellzahl unter dem Mikroskop in einer „Neubauer improved“ Zählkammer, bestimmt.

Das Deckglas wurde auf die seitlich befeuchtete Zählkammer aufgebracht und bis zum Erscheinen der Newtonringe leicht angedrückt. Mit der Pipette wurde eine geringe Menge Zellsuspension an der Kante des Deckglases angebracht. Durch Kapillarkräfte füllte sich die Kammer. Aus dem Mittelwert der gezählten Zellen in den vier Eckquadraten, die jeweils ein Volumen von 0,1 µl fassen, lässt sich die Zellmenge pro ml berechnen:

$$\text{Zellzahl} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

4.2.4 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff (- 196 °C) aufbewahrt.

Die Zellen wurden in Einfriermedium, bestehend aus FCS und Dimethylsulfoxid (DMSO) 9:1 (vol/vol), eingefroren. Das DMSO verhindert, dass sich während des Einfrierens auf - 80°C Eiskristalle bilden. Da DMSO auf metabolisch aktive Zellen zytotoxisch wirkt, ist es wichtig, gekühltes Einfriermedium zu verwenden und nach der Zugabe zu den Zellen zügig zu arbeiten, um sie schnellstmöglich bei - 80 °C einzufrieren. Die gewünschte Zellzahl betrug $1,5 \times 10^6$ Zellen in 1 ml Einfriermedium je Kryoröhrchen. Das abzentrifugierte Zellpellet wurde, nach Zellzahlbestimmung, mit der berechneten Menge Einfriermedium resuspendiert und zügig in die Kryoröhrchen überführt. Um ein gleichmäßiges Durchfrieren zu gewährleisten, wurden die Zellen zuerst 24 h bei - 80 °C im Kryocontainer gelagert, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Um die gefrorenen Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie nach der Entnahme aus dem Stickstoff im Wasserbad bei 37 °C angetaut. Zügig wurden die Zellen in ein Falconröhrchen mit warmen Kulturmedium überführt, um das toxische DMSO zu verdünnen. Nach vorsichtiger Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden in frischem Kulturmedium aufgenommen. Nach der Überführung in eine Zellkulturflasche wurden sie im Brutschrank inkubiert.

4.2.5 Mykoplasmentest

In der Zellkultur sind Infektionen mit Mykoplasmen im Gegensatz zu anderen Kontaminationen nicht sofort zu erkennen. Aus diesem Grund wurde in regelmäßigen Abständen ein Mykoplasmentest nach 4'6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) durchgeführt. DAPI bindet an DNA und bildet

fluoreszierende Komplexe. Bei kontaminierten Proben findet man punktuelle oder schleierartige Fluoreszenzen im Zytoplasma der Zellen.

2×10^4 Zellen/ml wurden in 5 ml Kulturmedium für 24-48 h in einer Petrischale im Brutschrank inkubiert. Nachdem ausreichend Zellen gewachsen waren, wurde der Überstand entfernt und die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Die 5 ml Fixiermittel wurden nach 10 min Einwirkzeit abgenommen und die Zellen luftgetrocknet. Die Farblösung, bestehend aus 5 µl DAPI-Stammlösung und 5 ml Mc Ilvaines Puffer, wurde für 10 min auf den Zellen belassen. Nach 30 min waschen unter fließendem Wasser wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop durch UV-Anregung mit dem DAPI-Filter, auf Mykoplasmen untersucht.

4.2.6 Vitalitätsbestimmung

Durch Anfärben der Zellen mit Trypanblau können lebende von toten Zellen unterschieden werden. Die Zellmembran toter Zellen ist durchlässig für den Farbstoff, weswegen sie sich blau färben. Eine intakte Zellmembran vitaler Zellen, verhindert hingegen deren Anfärbung.

Geringe Mengen der Zellsuspension wurden mit Trypanblau verdünnt (1:2). In der Zählkammer wurden sowohl die vitalen, als auch die toten Zellen gezählt und die Vitalität der Zellpassage wie folgt berechnet:

$$\text{Vitalität [\%]} = \text{Zahl vitaler Zellen} \times 100 / \text{Gesamtzellzahl}_{\text{vital+tot}}$$

4.2.7 Zytotoxizitätstest

Die toxische Wirkung der verwendeten Zytostatika auf die unterschiedlichen Zelllinien wurde durch die Bestimmung der IC_{50} (mittlere inhibitorische Konzentration) mit einem WST-1-Test (water soluble tetrazolium-1-Test) ermittelt. Das chromogene Tetrazoliumsalz (engl. water soluble tetrazolium salt, WST-1) (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-

Benzol-Disulfonat) wird von der mitochondrialen Dehydrogenase lebender Zellen in das orange-rote Formazan umgewandelt. Es kommt zu einem photometrisch messbaren Farbumschlag, der direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen korreliert.

Eine definierte Zellzahl wurde in 100 µl Kulturmedium in den Spalten 2-11 der Reihen B-G auf einer 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät. Medium in den am Rand befindlichen Wells verdunstet schneller als in weiter innen auf der Platte liegenden Wells. Um gleiche Bedingungen für alle Zellen zu schaffen, wurden diese ausschließlich mit 100 µl Medium befüllt (siehe Abbildung 5). Die Zellen wurden 24 h im Brutschrank inkubiert. Der Wirkstoff wurde in einer Verdünnungsreihe entweder jeweils 1:2 (vol/vol) oder 1:3 (vol/vol) mit Medium verdünnt (vgl. Tabelle 9). Die Verwendung von N-(2-Hydroxyethyl)piperazin- N'-(2-ethansulfonsäure)- (HEPES) gepuffertem Medium war nötig, um den pH-Wert trotz fehlender CO₂-Begasung während der einstündigen Behandlung im Wasserbad aufrecht zu erhalten. Nach der Abnahme des Kulturmediums (B-G, 1-11) wurden 100 µl des verdünnten Wirkstoffes in absteigender Konzentration auf die Zellen pipettiert (siehe Abbildung 5). Die Zellen der Reihe 11 dienten als 0-Wert. Dort wurde 100 µl wirkstofffreies, HEPES gepuffertes Medium zugegeben. In die zellfreie Reihe 1 wurde 100 µl HEPES gepuffertes Medium pipettiert. Diese Reihe stellte somit den Leerwert dar. Anschließend wurden die Platten durch mehrmaliges Umwickeln mit Parafilm abgedichtet, um das Eindringen von Wasser zu verhindern. Die Zellen wurden für 1 h bei 37 °C ± 1 °C bzw. bei 41 °C ± 1 °C im Wasserbad belassen. Im Anschluss wurden jedem Well 100 µl Standardkulturmedium zugegeben und die Zellen für weitere 48 h im Brutschrank inkubiert. Vor (0-Wert) und nach der Zugabe von 20 µl WST-1-Reagenz wurde die Absorption jedes Wells im Dynex MRX Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Bei der Auswertung wurde die Hintergrundabsorption (Leerwert, 0-Wert) abgezogen. Der ausschließlich temperaturbehandelte 0-Wert wurde mit den Ergebnissen der wirkstoffbehandelten Zellen in Relation gesetzt. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) beschreibt die Wirkstoffkonzentration, bei der 50% der Zellen abgetötet wurden.

$$S(c) = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + (c/c_0)^p}$$


S(c) % überlebende Zellen, die mit der Konzentration c behandelt wurden, verglichen mit den unbehandelten Zellen (c_0)

A_1 Startwert (100%)

A_2 Endwert (0%)

C_0 Wendepunkt ($\hat{=}$ IC₅₀)

P Power



	V1 [μM]	V2 [μM]	V3 [μM]	V4 [μM]	V5 [μM]	V6 [μM]	V7 [μM]	V8 [μM]	V9 [μM]
BN175									
1:2 Dox	3,10	1,55	0,78	0,39	0,19	0,10	0,05	0,02	0,01
1:3 Gem	209,26	69,75	23,25	7,75	2,58	0,86	0,29	0,10	0,03
1:3 Mito	29,60	9,87	3,29	1,10	0,37	0,12	0,04	0,01	0,005
AY27									
1:2 Dox	3,10	1,55	0,78	0,39	0,19	0,10	0,05	0,02	0,01
1:3 Gem	2,49	0,83	0,28	0,09	0,03	0,01	0,003	0,001	0,0004
1:3 Mito	3,470	1,157	0,386	0,129	0,043	0,014	0,005	0,002	0,001
DHD/K12/TRb									
1:3 Dox	345,0	115,00	38,33	12,78	4,26	1,42	0,47	0,16	0,05
1:3 Gem	12,43	4,14	1,38	0,46	0,15	0,0512	0,02	0,006	0,002
1:3 Mito	29,600	9,867	3,289	1,096	0,365	0,122	0,041	0,014	0,005

Tabelle 9 - WST-1-Test; Erstellen der Verdünnungsreihe

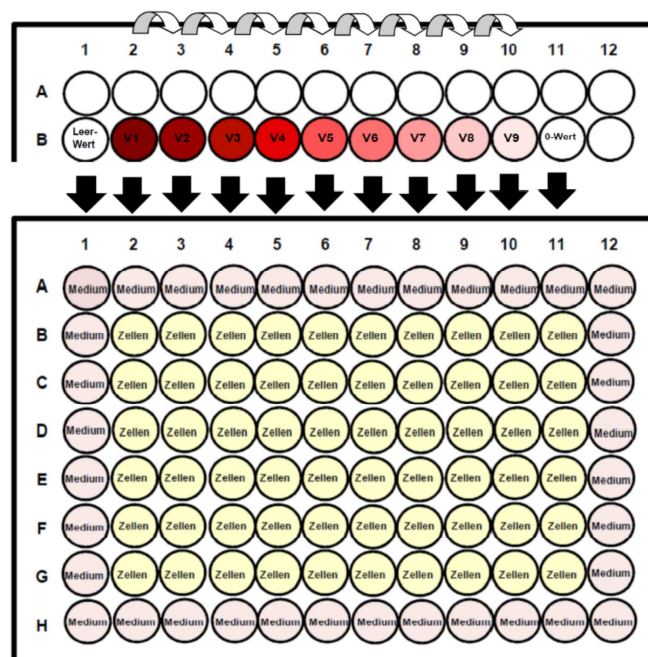


Abbildung 5 - WST-1-Test; Beimpfte 96-Well-Mikrotiterplatte und Behandlung der Zellen mit Wirkstoff der Verdünnungsreihe

4.2.8 Vorbereitungen für Tierversuche

Vorbereitung BN175

Als Ausgangsmaterial für die Tierversuche im Weichteilsarkom-Modell diene ein sogenannter Bulkumor. Das Tumorstadium wurde durch s.c. Tumorzellinjektion von $1,5 \times 10^6$ Zellen pro 50 µl Medium erreicht. Die Zellen wurden wie unter 4.2.2 und 4.2.3 beschrieben gewaschen, trypsinisiert, gezählt, abzentrifugiert und mit der berechneten Menge Medium resuspendiert. Jeweils 50 µl der Zellsuspension wurden in Eppendorf Gefäße abgefüllt.

Vorbereitung AY27

Das Tumorstadium in der Blase wurde durch eine Tumorzellinstillation von 4×10^6 Zellen in 500 µl Medium induziert. Auch hierfür wurden die Zellen gewaschen, trypsinisiert, gezählt, abzentrifugiert und mit der berechneten Menge Medium resuspendiert (siehe 4.2.2 und 4.2.3). Jeweils 500 µl der Zellsuspension wurden in Eppendorf Gefäße abgefüllt.

4.3 Tierversuche

4.3.1 Rahmenbedingungen

Die Grundlage dieser Experimente war ein am 06.02.2012 durch die Regierung von Oberbayern genehmigter Tierversuchsantrag mit dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-144-11.

Die Ratten wurden in einer konventionellen Versuchstierhaltung in Gruppen mit maximal vier Tieren gehalten (offene Haltung, Makrolonkäfige Typ IV, hoher Deckel, LIGNOCEL FS 14-Einstreu der Fa. ssniff, Fat Rat Hut der Fa. Bioserv, Zellstoff) bei freiem Zugang zu Wasser und Futter (Fa. ssniff Ratte-

Haltungsfutter). Der Hell-Dunkel Zyklus betrug 12 h bei einer Raumtemperatur von 21 °C. Nach der Anlieferung der Tiere im Institut wurde den Ratten eine Eingewöhnungsphase von mindestens 14 Tagen gewährt, bevor sie im Experiment verwendet wurden.

4.3.2 Anästhesie und Analgesie

Jegliche Manipulation an den Tieren wurde unter Inhalationsnarkose mit Isofluran vorgenommen. Die Narkoseeinleitung fand in einer Induktionskammer mit 5%igem Isofluran und 1 l/min medizinischem Sauerstoff als Trägergas statt. Die anästhesierten Tiere wurden aus der Kammer entnommen und zur weiteren Aufrechterhaltung der Narkose über eine Narkosemaske mit niedriger konzentriertem Isofluran (1,5%) begast. Um einen Wärmeverlust während der Anästhesie auszugleichen, wurden die Tiere auf einer Wärmematte gelagert. Die Temperatur der Wärmematte wurde über zirkulierendes Wasser aus einem Wasserbad konstant auf 38 °C gehalten.

Um etwaige Schmerzzustände während oder nach der Behandlung zu vermeiden, wurden die Tiere vor Behandlungsbeginn mit 100 mg/kg Metamizol und 0,5 mg/kg Meloxicam s.c. behandelt. Um die Tiere auch an den Tagen nach den Eingriffen analgetisch abzudecken, wurden sie zusätzlich mit 2,5 mg/100 ml Tramadol über das Trinkwasser versorgt.

4.3.3 Abbruch und Euthanasie

Die Euthanasie fand jeweils am Ende eines Experiments oder bei vorzeitigem Abbruch während des Versuchs in tiefer Inhalationsnarkose durch intravenöse (i.v.), intraperitoneale oder intrakardiale Injektion einer Überdosis Pentobarbital statt. Um die Notwendigkeit eines vorzeitigen Abbruchs beurteilen zu können, wurden im Vorfeld Abbruchkriterien definiert. Der Versuch musste bei Tumorexulzeration, invasivem Tumorwachstum,

Gewichtsverlust von über 15% bezogen auf das Normalgewicht, bei Auftreten klinischer Symptome und bei Beobachtung von Verhaltensauffälligkeiten, die auf Schmerzzustände hindeuteten, beendet werden. Außerdem wurden die Tiere euthanasiert, wenn die s.c. Tumoren über 3 cm³ groß waren bzw. wenn Blasentumoren über zwei Drittel des Blasenlumens der distendierten Blase einnahmen.

4.3.4 Pharmakokinetikstudien

Die Applikation von TSL *in vivo* und der Einfluss des Organismus auf deren Stabilität und Zirkulationszeit sind notwendige Informationen bezüglich ihrer Eignung zur zielgerichteten Therapie.

In den Pharmakokinetikstudien wurde die Wirkstoffkonzentration im Blut über einen Zeitraum von 120 min beobachtet. Den anästhesierten Ratten wurde ein 24G Venenverweilkatheter in die *V. coccygea lateralis* gelegt. Nach der i.v. Applikation des Wirkstoffs über den Venenverweilkatheter wurde an der *V. coccygea lateralis* der kontralateralen Seite, 1-1,5 cm von der Schwanzspitze entfernt, mit einem Skalpell ein 2 mm tiefer Schnitt gesetzt und so eine Blutung erzeugt. 2 min, 10 min, 30 min, 60 min, 90 min und 120 min nach i.v. Applikation des Wirkstoffes wurde den Tieren jeweils ca. 200 µl Blut entnommen und in einer Lithium-Heparin Mikrovette aufgefangen. Zur Plasmagewinnung wurde jede Blutprobe sofort 10 min bei 2000 g zentrifugiert und das Plasma in Probenröhrchen überführt. Die Plasmaprobe wurde bis zur Konzentrationsbestimmung mittels HPLC-Analyse bei - 20 °C eingefroren.

Doxorubicin	Stamm/ Anzahl (n)	Dosis	Blutentnahme [min nach Injektion]	Wiederholung [min nach Injektion]
TSL(Dox)	F344/ 3	2 mg/kg	Tag 0 2-10-30-60-90-120	Tag 7 2-10-30-60-90-120
	3		Tag 0 2-10-30-60-90-120	Tag 14 2-10-30-60-90-120
Gemcitabin				
TSL(Gem)	F344/ 3	6 mg/kg	0-2-10-30-60-90-120	
Mitomycin C				
TSL(Mito)	BN/ 4	0,1 mg/kg	0-2-10-30-60-90-120	
fMito	BN/ 3	0,1 mg/kg	0-2-10-30-60-90-120	

Tabelle 10 - Überblick Pharmakokinetikstudien

4.3.5 Weichteilsarkom–Modell

Generierung von s.c. Weichteilsarkomen

1,5 x 10⁶ Zellen in 50 µl Medium wurden wie unter 4.3.5 beschrieben vorbereitet. Den narkotisierten BN wurden die Haare an den Hintergliedmaßen rasiert und die Haut desinfiziert. Mit einer Spritze wurde den Tieren die vorbereitete Zellsuspension (siehe 4.2.8) s.c. injiziert. Aufgrund dieser Tumorzellinjektion entstand nach 10-14 Tagen ein ca. 1 cm³ großer Bulkumor. Durch Transplantation kleiner Fragmente dieses „Spendertumors“ wurden die für die Experimente benötigten Tumoren generiert. Das Arbeiten mit Bulkumoren hat den Vorteil, dass ein regelmäßiges Tumorwachstum erreicht wird. Zellversprengungen und invasives Tumorwachstum werden bei Anwendung dieser Methode vermieden.

Nach Euthanasie der Ratte wurde der Tumor entnommen und 2 mm große Tumorstücke abgetrennt. Die Stücke wurden sofort auf ein anderes Tier transplantiert oder in flüssigem Stickstoff gelagert. Dafür wurde zuvor Einfriermedium, bestehend aus RPMI Medium und DMSO 9:1 (vol/vol), auf Eis gestellt und je zwei Tumorstücke in ein Kryoröhrchen mit 1 ml Einfriermedium gegeben. Zuerst wurden die Tumorstücke in einem Kryocontainer bei - 80 °C eingefroren, bevor sie 24 h später in den Stickstofftank überführt wurden.

Um die Tumorstücke aufzutauen, wurde der angetaute Inhalt der Röhrchen in frisches Medium überführt. Um das toxische DMSO zu entfernen, wurde das Medium entnommen und erneut frisches Medium auf die Tumorstücke gegeben.

Bei der Implantation wurde die Ratte an der linken Hintergliedmaße geschoren und nach gründlicher Desinfektion die Haut in Höhe des Kniegelenks mit einem Scherenschlag eröffnet. Mit einer Pinzette wurde ein subkutaner Tunnel gebildet, in den das Tumorstück möglichst tief eingebracht wurde. Die Hauttasche wurde mit chirurgischem Nahtmaterial mit ein bis zwei Einzelknöpfen verschlossen.

Kontrolle des Tumorwachstums

Der Tumor wurde jeden zweiten Tag mit einem digitalen Messschieber in drei Ebenen (a = max. Länge, b = max. Breite, c = max. Höhe) vermessen. Mit der Ellipsoidformel wurde das Tumolvolumen (V) berechnet.

$$V = a \times b \times c \times \pi/6$$

Des Weiteren wurde das Körpergewicht dokumentiert und der Allgemeinzustand der Tiere kontrolliert.

Therapiestudie

Sobald der Durchmesser des Tumors 0,5 cm erreichte, wurde mit der Therapie begonnen. Den anästhesierten Ratten wurde ein 24 G Venenverweilkatheter in die *V. coccygea lateralis* gelegt und mit einem IN-Stopper verschlossen. Anschließend wurde die Ratte in Bauchlage auf der Wärmematte platziert und die tumortragende Hintergliedmaße seitlich fixiert. Nach Rasur und Hautdesinfektion wurde bei allen Gruppen zentral eine intratumorale Temperatursonde platziert. Die Körpertemperatur wurde rektal gemessen.

Der Tumor wurde entweder durch Erwärmung mit einer stufenlos verstellbaren Kaltlichtlampe lokal (siehe Abbildung 6) oder regional durch Eintauchen der Gliedmaße in ein Wasserbad erwärmt. Bei der Lampenhyperthermie wurde das umliegende Gewebe zur Isolierung mit einem Tupfer abgedeckt, bei der Wasserbad-Methode wurde die Gliedmaße mit Folie umwickelt, um sie zu schützen. Nach ca. 30 min mit der Lampenhyperthermie bzw. ca. 10-15 min im Wasserbad wurde die Zieltemperatur von 41 °C erreicht. Erst dann wurde die Wirkstoffformulierung i.v. injiziert und die einstündige HT-Behandlung begonnen.

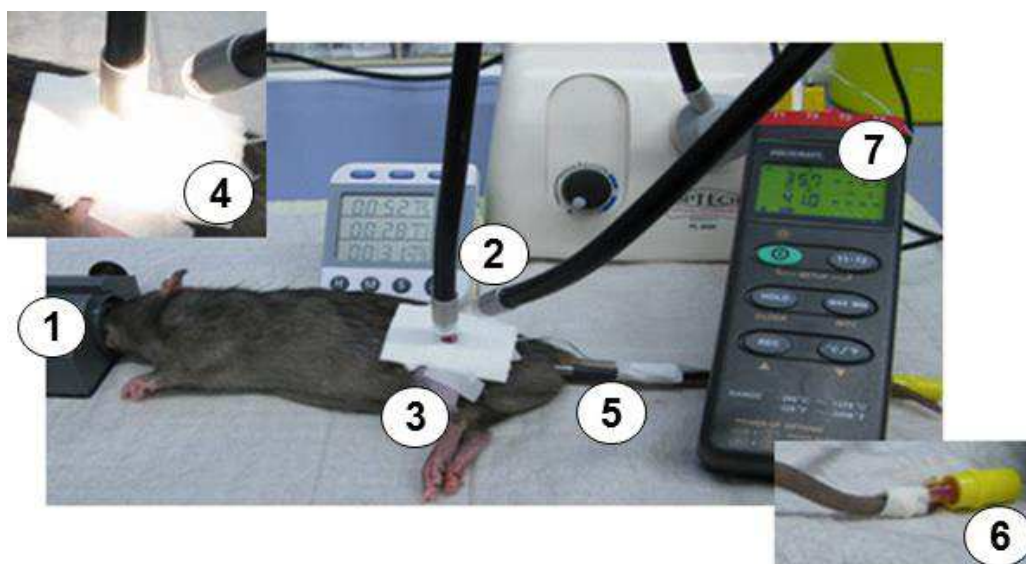


Abbildung 6 - Aufbau Lampenhyperthermie; 1 Inhalationsmaske für Narkose, 2 Kaltlichtlampe, 3 Tumortragende Hintergliedmaße, 4 Erwärmung mit Licht, 5 rektale Temperatursonde, 6 i.v. Zugang *V. coccygea lateralis*, 7 Temperaturmessgerät

Formulierung	Dosis [mg/kg]	Hyperthermie	n
Physiologische Kochsalzlösung		+HT Lampe	9
Gem	6	-HT	10
	6	+HT Lampe	6
TSL(Gem)	6	-HT	6
	6	+HT Lampe	6
	6	+HT Wasserbad	3

Tabelle 11 - Übersicht der Therapiestudie mit Gem

4.3.6 Blasenkarzinom–Modell

Generierung von Blasenkarzinomen

Die Zelllinie AY27 generiert Urothelkarzinome in F344. Durch chemische Vorbehandlung der Blasenschleimhaut kann ein Urotheldefekt erzeugt werden. Eine anschließende AY27 Tumorzellinstillation ermöglicht das Anwachsen der Zellen an der defekten Stelle.

Die anästhesierten weiblichen Ratten wurden mit einem zum Blasenkatheter umfunktionierten 16G Venenverweilkatheter katheterisiert und in Rückenlage auf der Wärmematte positioniert. Durch manuelle Kompression der Blase wurde diese entleert und anschließend mehrmals mit 0,5 ml PBS gespült. Nach einer erneuten, vollständigen Entleerung der Blase wurde diese mit Luft gefüllt und ein mit 0,1 N Salzsäure getränkter Mikro-Tupfer über den Katheter eingeführt. Dieser wurde für 15 s mit Kontakt zur Blasenwand belassen. Neutralisiert wurde die Säure durch einen mit 0,1 N Natronlauge getränkten Mikro-Tupfer der ebenfalls für 15 s die Blasenwand berührte. Anschließend wurde die Blase erneut gründlich mit PBS gespült. Eine Zellsuspension von 4×10^6 AY27 Zellen in 500 μ l Medium (siehe 4.2.8), wurde für 1 h in der Blase instilliert. Der Katheter wurde mit einem IN-Stopper

verschlossen und die im Katheter verblieben Zellsuspension mit Luft, über den Injektionsport, vollständig in das Blasenlumen vorgeschoben. Nach einstündiger Inkubation wurde der Katheter gezogen. Die Ratte setzte die in der Blase verbliebene Zellsuspension während der Aufwachphase spontan ab [56].

Kontrolle des intravesikalen Tumorwachstums

Jeden zweiten Tag wurde die Blase mit einem fiberoptischen Nadelarthroskop zystoskopiert, um das Tumorwachstum zu kontrollieren [57]. Mit dem Arthroskopschaft wurde die narkotisierte Ratte katheterisiert und nach Spülung der Blase das Arthroskop eingeführt. Über die seitliche Öffnung des Schaftes wurde die Blase durch Luftzufuhr dilatiert und die Wand der Blase beurteilt. Neben der Beurteilung der Blase wurde außerdem auf Verhaltensauffälligkeiten, Exterieur und Gewicht der Tiere geachtet.

Tumorhistologie

Um die nach Tumorzellinokulation entstandenen Umfangsvermehrungen eindeutig charakterisieren zu können, wurde sieben Tage nach Tumorzellinstillation die Blase einer euthanasierten Ratte entnommen und in 4% Formaldehyd-Lösung fixiert. Im Institut für Pathologie am Klinikum der Universität München, Campus Großhadern, wurde nach Standardmethoden histologische Schnitte angefertigt, das Gewebe angefärbt (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) und beurteilt.

Etablierung der Hyperthermiebehandlung

Die Erwärmung der Blase auf 41 °C wurde durch eine kontinuierliche Spülung der Blase mit warmer Kochsalzlösung erreicht.

Die narkotisierte Ratte wurde mit einem Venenverweilkatheter in der *V. coccygea lateralis* und zwei intravesikalen Kathetern (24G und 18G) in Rückenlage auf einer Plexiglasscheibe platziert. Die Plexiglasscheibe war mit Aussparungen versehen, über welche das ablaufende Wasser in die darunterliegende Auffangwanne tropfen konnte. Über ein Schlauchsystem wurde mit einer Peristaltikpumpe aus einem Wasserbad erwärmte

physiologische Kochsalzlösung durch den 24 G Katheter in die Blase geleitet. Die Körpertemperatur wurde über eine Rektalsonde gemessen. Zur Überprüfung der intravesikalen Temperatur wurde die Temperatur in der ablaufenden Kochsalzlösung am Katheterausgang gemessen. Nach 10-20 min wurde die intravesikale Zieltemperatur von 41 °C erreicht, der Wirkstoff über den Venenzugang injiziert und darauf folgend die Blase 1 h wärmebehandelt.

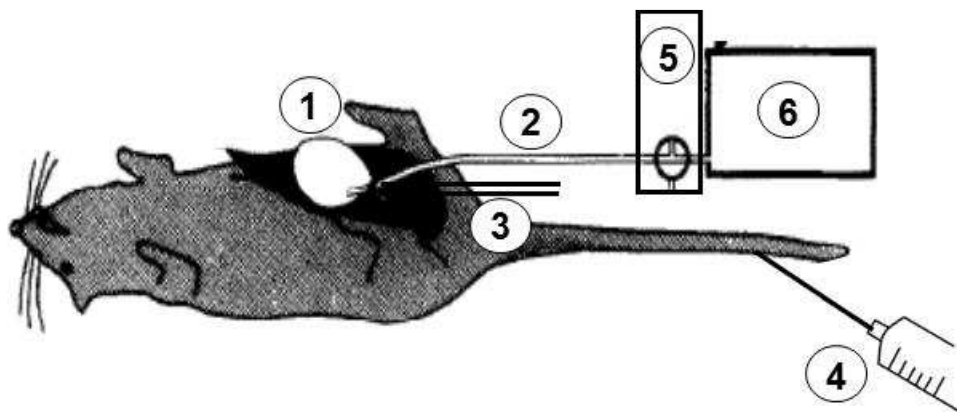


Abbildung 7 - Schematische Darstellung der Hyperthermiebehandlung der Blase;

1 Blase, 2 Katheter für zulaufendes Wasser, 3 Katheter für ablaufendes Wasser, 4 Injektion in die V. coccygea lateralis, 5 Peristaltikpumpe, 6 Wasserbad; [Modifiziert nach 58]

Anreicherung und Organverteilung

Die Anreicherungsstudie wurde sowohl an Tieren ohne, als auch an Tieren mit Blasentumor durchgeführt. Die Tumoren in den Blasen der Ratten wurden wie bereits unter 4.3.6 beschrieben generiert und das Wachstum in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Tumortragende Ratten wurden nach sieben Tagen, bei zystoskopisch deutlich erkennbaren Umfangsvermehrungen behandelt. Bei Tieren mit HT-Behandlung wurde wie unter 4.3.6 beschrieben verfahren. Den Ratten der Gruppe mit intravesikaler Therapie wurden 18G Katheter in die Blase eingeführt, welche mit einem IN-Stopper verschlossen wurden. Über den Injektionsport wurde der mit physiologischer Kochsalzlösung auf 0,5 ml verdünnte Wirkstoff injiziert. Alle 15 min wurde die jeweilige Ratte um 90° in der Längsachse gedreht, um die gesamte Blase dem Wirkstoff gleichmäßig auszusetzen. Nach 60 min Einwirkzeit wurde die Blase entleert und mit physiologischer Kochsalzlösung

gespült, um Wirkstoffrückstände aus dem Blasenlumen zu entfernen. Bei der intravesikalen Chemotherapie wurde von der Erwärmung der Blase abgesehen. Bei Zugabe von Dox in die physiologische Kochsalzlösung des Wasserbads wäre die Kontaminationsgefahr zu groß gewesen.

Im Anschluss an die Behandlung wurde den euthanasierten Tieren der 60 min Blutwert mit einer Spritze aus dem Herzen entnommen und in eine Mikrovette überführt. Das Plasma wurde wie unter 4.3.4 beschrieben gewonnen und bis zur Aufarbeitung bei - 20 °C gelagert. Danach wurden Bauchhöhle und Brustkorb eröffnet und der rechte Herzvorhof perforiert. Eine Butterflykanüle mit aufgesetzter Spritze wurde in die linke Herzkammer geschoben und durch langsame Injektion von Kochsalzlösung der gesamte Kreislauf perfundiert. Der Vorgang wurde so lange fortgesetzt, bis das aus der eröffneten Vorkammer ablaufende Wasser klar war. Danach wurden das Herz, der mittlere Leberlappen, die Milz und die rechte und linke Niere entnommen. Die Blase wurde entnommen, eröffnet und in Kochsalz gewaschen. Danach wurde sie in einer mit Silikon gefüllten und mit Agarosgel überzogenen Petrischale festgesteckt und unter dem Mikroskop das Urothel von der *Tunica muscularis* abgelöst. Die getrennten Blasenschichten und alle weiteren Proben wurden bis zur Konzentrationsbestimmung bei - 20 °C gelagert.

Formulierung	Dosis	Injektion	HT	Blasen-tumor	n
Dox	5 mg/kg	i.v.	+	-	6
Dox	5 mg/kg	intravesikal	-	-	7
Dox	0,5 mg/Tier	intravesikal	-	-	3
Dox	0,5 mg/Tier	intravesikal	-	+	3
TSL(Dox)	5 mg/kg	i.v.	+	-	5
TSL(Dox)	5 mg/kg	i.v.	+	+	3
TSL(Dox)	0,5 mg/kg	i.v.	+	+	3

Tabelle 12 - Übersicht Gruppen; Anreicherung und Organverteilung Dox; i.v. = intravenös

4.4 Konzentrationsbestimmung im Probenmaterial

Sowohl die quantitative Bestimmung des liposomal eingeschlossenen Gem und Mito, als auch die Konzentrationsbestimmung aller Wirkstoffe im Probenmaterial wurde mit Hilfe von HPLC-Analytik gemessen.

4.4.1 Doxorubicinbestimmung in Plasma- und Gewebeproben

Durch Flüssigextraktion nach einem modifizierten Protokoll von Galettis et al. [59] wurde Dox aus 50 µl Plasma bzw. 100 mg Gewebe isoliert. Das Gewebe wurde mit 1,5 ml Methanol/H₂O 2:1 (vol/vol) im TissueLyser (30 Hz, 5 min) homogenisiert und die DNA-Bindungen des Wirkstoffs mit Silbernitrat (33% w/v) gelöst [60].

Je 50 µl der extrahierten Probe wurden über einen Autoinjektor auf eine C18 Säule (250 mm x 4,6 mm innerer Durchmesser, 5 µl Partikelgröße, Porengröße 125-Å) der HPLC (510 HPLC-Pumpe, 717plus Autosampler, 470 Fluoreszenzdetektor) gegeben und mit einem isokratischen Fluss von 1 ml/min eluiert. Kaliumdihydrogenphosphat/Acetonitril 73:27 (vol/vol) diene als mobile Phase. Die Fluoreszenz wurde bei einer Extinktionswellenlänge von 48 nm und einer Emissionswellenlänge von 560 nm detektiert. Als interner Standard diene Daunorubicin, als Referenzstandard Adrimedac® oder Doxorubicin Accord®.

4.4.2 Gemcitabinbestimmung in wässrigen Proben

Eine Methode von Lanz et al. [61] wurde wie in Limmer et al. [37] beschrieben modifiziert, um die Konzentration von Gem in flüssigen Proben mittels HPLC zu bestimmen. Der isokratische Fluss betrug 0,5 ml/min bei dem die Probe über die auf 40°C beheizte Säule (C18-Säule, 3 mm x 100 mm innerer Durchmesser, 2,6 µm Partikelgröße, Porengröße 100 Å) der Waters HPLC (515 HPLC-Pumpe, 717plus Autosampler, UV-Detektor 990E, λ = 275 nm) eluierte. Als mobile Phase wurde 10 mM Kaliumdihydrogen-

phosphat pH 7 verwendet. Als Interner Standard diene 5-FU und als Referenzstandard Gemzar[®].

4.4.3 Mitomycin C–Bestimmung in wässrigen Proben

Die Extraktion von Mito erfolgte analog zu Gem, beschrieben unter 4.4.2 [37]. Als mobile Phase wurde Acetonitril 30% verwendet. Die Säule als stationäre Phase entsprach jener für die Dox-Bestimmung (4.4.1). Als Interner Standard wurde 4'-Aminoacetophenon verwendet. Als Referenzstandard diene Mitomycin medac[®]. Die Probe wurde mit dem UV-Detektor (UV-Detektor 490E) bei einer Wellenlänge von 350 nm gemessen.

5 Ergebnisse

5.1 Liposomen

5.1.1 Charakterisierung von Mitomycin C-Liposomen

Erstmals wurde Mito in DPPG₂-TSL eingeschlossen. Die beiden unabhängigen Chargen wurden charakterisiert und die Stabilität *in vitro* getestet.

Der passive Einschluss ermöglichte die Herstellung von Liposomen, die bezogen auf das Verhältnis zwischen Wirkstoff- und Lipidkonzentration, das ζ -Potential, die Vesikelgröße und den PDI vergleichbar waren. Die Konzentration des eingeschlossenen Wirkstoffs war gerade noch ausreichend, um den Tieren eine Dosis von 0,1 mg/kg i.v. injizieren zu können. Bei einer höheren Dosierung wäre es zu einer Volumenüberladung gekommen. Die Entstehung von unerwünschten Lysolipiden, wie Lyso-PG₂ und Lyso-PC, während der Liposomenherstellung wurde durch Dünnschichtchromatographie untersucht und konnte ausgeschlossen werden (Tabelle 13).

Bezeichnung	c _{Lipid} (mM)	c _{Wirkstoff} (mM)	Wirkstoff/Lipid Verhältnis (mol/mol)	ζ (mV)	Vesikel- größe (nm)	PDI	DC	
							DPPG ₂ (%)	Lyso-PC (%)
[23/24M]	18,3	0,0285	0,0016	-25,7	172	0,21	21,3	0,0
[23/25M]	16,4	0,0487	0,0030	-24,3	176	0,19	24,0	0,0
MW	17,4	0,0386	0,0023	-25,0	174	0,20	22,7	0,0
SA	1,3	0,0143	0,0010	1,0	3	0,01	1,9	0,0

Tabelle 13 - Charakterisierung von TSL(Mito); c_{Lipid} = Lipidkonzentration, c_{Wirkstoff} = Wirkstoffkonzentration, **Wirkstoff/Lipid** = Wirkstoff zu Lipid Verhältnis, ζ = ζ -Potential, **Vesikelgröße** = Liposomengröße, **PDI** = Polydispersionsindex, DC = Dünnschichtchromatographie

5.1.2 Temperaturabhängige Mitomycin C-Freisetzung

Die temperaturabhängige Freisetzung von Mito aus den Liposomen wurde sowohl in HN-Puffer pH 7,4 als auch in FCS gemessen. Innerhalb von 5 min war bei 37 °C die Freisetzung in HN-Puffer bzw. FCS mit $33,4 \pm 12,9\%$ bzw. $37,6 \pm 11,6\%$ vergleichbar hoch. Bei 41°C liegt die Mito-Freisetzung in HN-Puffer bei $82,6 \pm 12,2\%$, während in FCS $101,5 \pm 22,8\%$ freigesetzt wurden. Bei Temperaturen > 42 °C ist unabhängig vom Milieu ein Rückgang in der Freisetzungsmenge erkennbar (Abbildung 8).

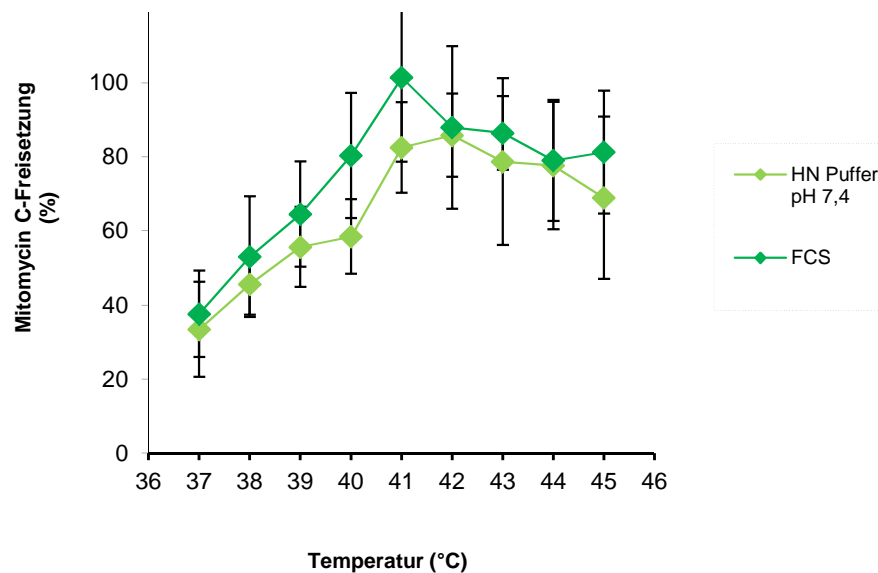


Abbildung 8 - Temperaturabhängige Mito-Freisetzung;
gemessen in HN-Puffer und FCS

5.2 Zellkultur

Für die Durchführung der Zytotoxizitätstests wurde zuerst die optimale Zellzahl für die Aussaat in die 96-Well Platten bestimmt. Mit verschiedenen Zellzahlen pro Well (3000 Zellen/Well, 5000 Zellen/Well, 7000 Zellen/Well, 9000 Zellen/Well, 11.000 Zellen/Well, 13.000 Zellen/Well) und unter täglicher Wachstumskontrolle mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie wurde für jede Zelllinie die geeignete Zellmenge ermittelt. Das Kriterium für die Entscheidung war, dass nach 24 h Inkubation ein ausreichend dichter

Zellrasen für eine Behandlung entstanden sein musste. Die Zellzahl sollte aber so gering gehalten werden, dass auch Zellen der unbehandelten Kontrolle uneingeschränkt bis 24 h nach der Behandlung unter diesen, von Platz- und Nährstoffangebot her, begrenzten Verhältnissen wachsen konnten. Aufgrund der unterschiedlichen Verdopplungszeiten eignete sich für die Zelllinie BN175 eine Aussaat von 5000 Zellen/ Well, für die Zelllinie AY27 7000 Zellen/ Well und für die Zelllinie DHD/K12/TRb eine Aussaat von 9000 Zellen/ Well.

Auch die geeignete Anfangskonzentration und Verdünnungsstufe wurde in Vorexperimenten ermittelt. Die gewählten Verdünnungen sollten sowohl toxische als auch untoxische Konzentrationsbereiche umfassen (Tabelle 9). Durch Zugabe von Wirkstoff in aufsteigender Konzentration und einstündige Behandlung \pm HT konnte eine Dosis–Wirkungskurve ermittelt werden, welche es ermöglichte, die IC_{50} zu berechnen.

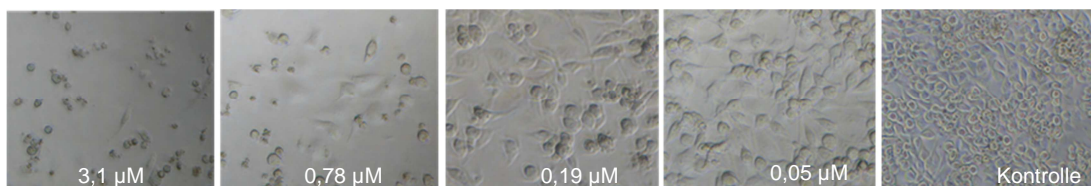


Abbildung 9 - Zytotoxizitätstest BN175 Zellen; 48 h nach Behandlung Dox +HT

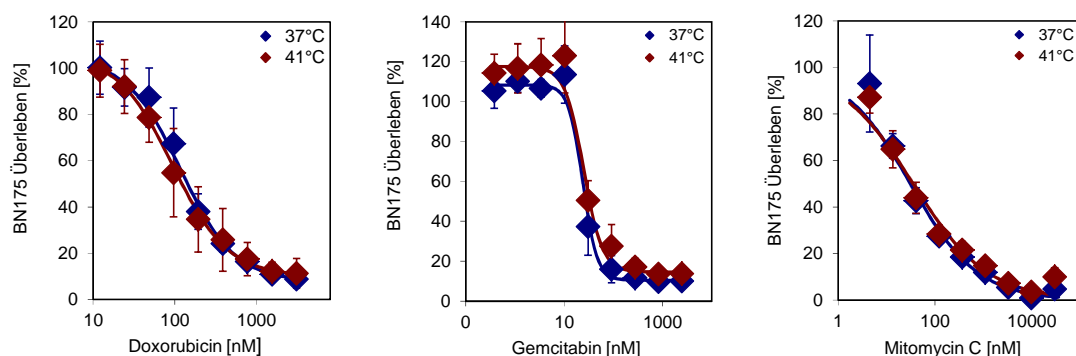


Abbildung 10 Dosis-Wirkungskurve für die Zelllinie BN175

60 min Behandlung \pm HT mit Dox/Gem/Mito

BN175	IC ₅₀ [nM] 37°C	R ²	IC ₅₀ [nM] 41°C	R ²	n
Dox	118,61 ± 16,7	0,99461	94,26 ± 8,33	0,99797	5
Gem	24,00 ± 2,75	0,99706	24,91 ± 2,62	0,98921	4
Mito	31,09 ± 10,07	0,92238	35,41 ± 9,04	0,95439	4

Tabelle 14 - IC₅₀ für die Behandlung der Zelllinie BN175; Behandlung ±HT und Dox, Gem oder Mito, **IC₅₀** = mittlere inhibitorische Konzentration, **R²** = Grad der Bestimmtheit, **n** = Anzahl

BN175 Zellen zeigten ein Ansprechen auf alle Wirkstoffe (siehe Abbildung 10). In der Phasenkontrastmikroskopie präsentierten sich in Wells mit hohen Wirkstoffkonzentrationen vereinzelt noch adhärente Zellen. Anzeichen für podienartige Zellausläufer zur interzellulären Kontaktaufnahme gab es keine. Anstatt der sonst spindelförmigen Morphologie war die Gestalt der Zellkörper rundlich. Je niedriger die Wirkstoffkonzentration, umso vitaler und dichter wurde der Zellrasen. Die Zellen der unbehandelten Kontrolle wuchsen nahezu konfluent. Beispielhaft wird dies in Abbildung 9 an mit HT und Dox behandelten Zellen veranschaulicht.

Die Messung am ELISA-Lesegerät 1 h nach Zugabe des WST-1 Reagenz ergab die in Abbildung 10 dargestellten Dosis-Wirkungskurven für die drei verwendeten Wirkstoffe. Die IC₅₀-Konzentration für Gem mit bzw. ohne HT lag bei 24,00 ± 2,75 nM bzw. bei 24,91 ± 2,62 nM und für Mito bei 31,09 ± 10,7 nM bzw. bei 35,41 ± 9,04 nM. Die IC₅₀ für Dox zeigte bei dieser Zelllinie die Tendenz zu einer erhöhten Toxizität durch simultane HT-Behandlung. Die IC₅₀ für Dox betrug 118,61 ± 16,7 nM mit HT und 94,26 ± 8,33 nM ohne HT (vgl. Tabelle 14).

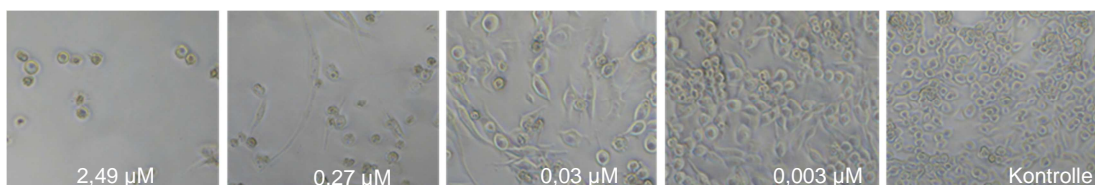


Abbildung 11 - Zytotoxizitätstest AY27; 48 h nach Behandlung mit Gem -HT

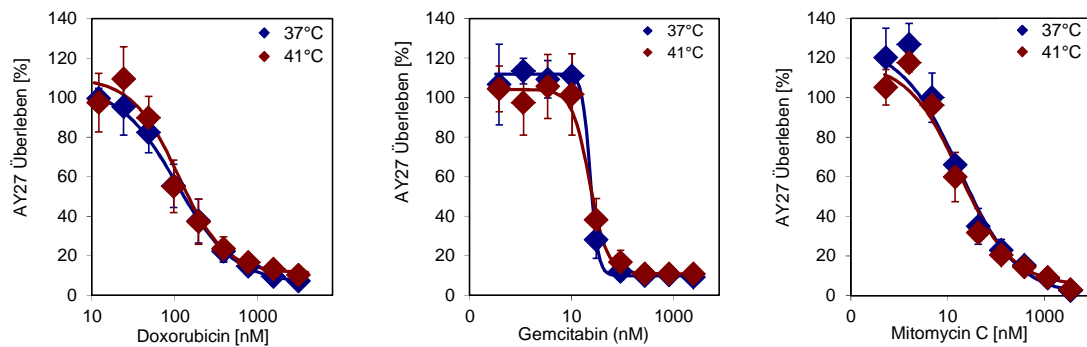


Abbildung 12 Dosis-Wirkungskurve für die Zelllinie AY27

60 min Behandlung ± HT mit Dox/Gem/Mito

AY27	IC ₅₀ [nM] 37°C	R ²	IC ₅₀ [nM] 41°C	R ²	n
Dox	100,81 ± 5,93	0,99909	86,69 ± 11,84	0,96894	5
Gem	23,31 ± 2,58	0,99897	22,70 ± 2,35	0,99271	4
Mito	17,46 ± 2,41	0,98516	17,83 ± 5,27	0,94694	4

Tabelle 15 - IC₅₀ für die Behandlung der Zelllinie AY27; Behandlung ± HT und Dox, Gem oder Mito, **IC₅₀** = mittlere inhibitorische Konzentration, **R²** = Grad der Bestimmtheit, **n** = Anzahl

Repräsentativ für alle drei Wirkstoffe ist in Abbildung 11 die mikroskopisch deutlich erkennbare, steigende zytotoxische Wirkung bei höherer Konzentration dargestellt. Morphologisch ist der Effekt vergleichbar mit dem der BN175 Zellen bei der Behandlung mit den verwendeten Wirkstoffen (siehe Abbildung 9). Deutlich erkennbar sind einzelne, geschädigte, kugelige Zellen bei einer Konzentration von 2,49 µM. Bei sinkender Wirkstoffkonzentration kommt es zu einer stetigen Verdichtung des Zellrasens und zunehmender Vitalität der Zellen (siehe Abbildung 11).

Aus der gemessenen Umsetzung des WST-1 Reagenz und den daraus resultierenden Dosis-Wirkungskurven ergaben sich für Dox und Gem vergleichbare IC₅₀-Werte wie bei der Zelllinie BN175. Die IC₅₀ der AY27 Zellen für Dox mit bzw. ohne HT liegt bei 100,81 ± 5,93 nM bzw. 86,69 ± 11,84 nM und für Gem bei 23,31 ± 2,58 nM bzw. 22,70 ± 2,35 nM. Die

Empfindlichkeit gegenüber Mito erscheint bei die AY27 Zellen mit einer IC_{50} von $17,46 \pm 2,41$ nM bzw. $17,83 \pm 5,27$ nM im Vergleich zu der der BN175 Zellen erhöht (vgl. Tabelle 15).

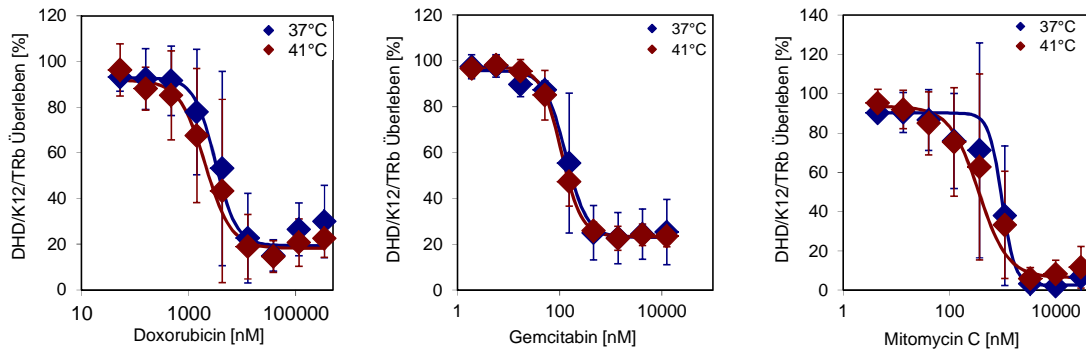


Abbildung 13 Dosis-Wirkungskurve für die Zelllinie DHD/K12/TRb

60 min Behandlung \pm HT mit Dox/Gem/Mito

DHD/K12/TRb	IC_{50} [nM] 37°C	R^2	IC_{50} [nM] 41°C	R^2	n
Dox	$3158,48 \pm 1442,66$	0,97787	$2043,8 \pm 778,55$	0,98014	4
Gem	$130,81 \pm 33,99$	0,98213	$107,78 \pm 5,36$	0,99944	4
Mito	$958,47 \pm 210,86$	0,9988	$353,8 \pm 146,5$	0,98873	3

Tabelle 16 - IC_{50} für die Behandlung der Zelllinie DHD/K12/TRb; Behandlung \pm HT und Dox, Gem oder Mito, IC_{50} = mittlere inhibitorische Konzentration, R^2 = Grad der Bestimmtheit, n = Anzahl

Die Dosis-Wirkungskurven und die IC_{50} -Werte der Zelllinie DHD/K12/TRb weichen deutlich von denen der anderen beiden Zelllinien ab. IC_{50} -Werte von $3158,48 \pm 1442,66$ nM bzw. $2043,8 \pm 778,55$ nM bei einer Behandlung mit Dox mit bzw. ohne HT können als Unempfindlichkeit der Zelllinie gegenüber diesem Wirkstoff gedeutet werden. Auch Mito mit einer IC_{50} von $958,47 \pm 210,86$ nM bzw. $353 \pm 146,5$ nM kann als nur mäßig wirksam eingestuft werden. Das von den getesteten Wirkstoffen für DHD/K12/TRb Zellen am toxischsten wirkende Zytostatikum ist Gem. Es zeigte mit einer IC_{50} von $130,81 \pm 33,99$ nM bzw. $107,78 \pm 5,36$ nM in Kombination mit bzw. ohne HT immer noch eine vielfach geringere Empfindlichkeit als die Messungen für die Zelllinien BN175 und AY27 ergaben (vgl. Tabelle 16).

5.3 Tierversuche

5.3.1 Liposomenstabilität *in vivo*

TSL(Mito)-Stabilität im Plasma der Brown Norway Ratte

Vergleichbar mit der *in-vitro*-Freisetzung von Mito aus den Liposomen zeigen sich die Liposomen auch *in vivo* nach i.v. Injektion instabil. Aufgrund der geringen Einschlusseffizienz bei der Herstellung der TSL(Mito) (vgl. Tabelle 13) und dem daraus resultierenden großen Injektionsvolumen war hier der limitierende Faktor eine Volumenüberladung der Tiere zu vermeiden. Deshalb wurde die Dosis mit 0,1 mg/kg entsprechend niedrig gewählt. Unter der Annahme, dass das Plasmavolumen der Ratte 4% des Körpergewichts ausmacht, könnte bei der verwendeten Dosis rechnerisch eine maximale Wirkstoffkonzentration (c_{\max}) von 25 $\mu\text{g/ml}$ erreicht werden [62]. Die gemessene Plasmakonzentration 2 min nach Injektion lag bei $0,78 \pm 0,38 \mu\text{g/ml}$. Dieser Wert entsprach etwa 3% der theoretischen c_{\max} . Nach 10 min konnten nur noch $0,34 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$ Mito im Plasma nachgewiesen werden (Tabelle 17). Die Messungen der Plasmakonzentrationen nach 30 min, 60 min, 90 min und 120 min sowie die aller Messzeitpunkte bei nicht liposomal verabreichtem Mito ergaben so niedrige Konzentrationen, dass die Ergebnisse nicht sinnvoll auswertbar waren. Im Elutionsdiagramm waren keine deutlich abgrenzbaren Peaks erkennbar. Die Messwerte lagen somit unter der Nachweisgrenze der Methode und wurden daher nicht angeführt.

Zeit [min]	Mit -Konz [$\mu\text{g/ml}$]				MW [$\mu\text{g/ml}$]	Stabw.
	Tier A	Tier B	Tier C	Tier D		
2	0,28	0,88	1,33	0,64	0,78	0,38
10	0,17	0,42	0,48	0,30	0,34	0,12

Tabelle 17 - Mito-Plasmakonzentration nach i.v.-Applikation von 0,1 mg/kg TSL(Mito)

TSL(Dox)-Stabilität im Plasma der F344 Ratte

TSL(Dox) zeigte eine hohe *in-vivo*-Stabilität nach i.v.-Applikation (siehe Abbildung 14). Bei der verwendeten Dosis von 2 mg/kg bzw. 5 mg/kg betrug die rechnerisch ermittelte c_{\max} 50 µg/ml bzw. 125 µg/ml. Die initiale Plasmakonzentration 2 min bzw. 10 min nach Injektion von 2 mg/kg TSL(Dox) betrug $39,2 \pm 7,38$ µg/ml bzw. $36,5 \pm 2,38$ µg/ml. Das entspricht 79% bzw. 73% der errechneten, theoretisch erreichbaren c_{\max} . 90 min nach der Injektion waren noch $20,0 \pm 5,71$ µl/ml Dox im Plasma vorhanden und damit 40% der c_{\max} . Die Plasmahalbwertszeit ($t_{1/2}$) betrug 96,8 min (Tabelle 18). Bei erneuter Applikation nach 7 bzw. 14 Tagen betrug die Konzentration 2 min nach i.v.-Applikation $31,8 \pm 3,92$ bzw. $40,8 \pm 0,73$ µg/ml (64% bzw. 82% von c_{\max}) und 10 min nach Injektion $34,3 \pm 5,57$ µg/ml bzw. $41,5 \pm 12,02$ µg/ml (69% bzw. 83% von c_{\max}). Die gemessene Dox-Konzentration im Plasma nach 90 min betrug $18,1 \pm 2,25$ µg/ml bzw. $22,8 \pm 3,85$ µg/ml (36% bzw. 46% von c_{\max}). Daraus ergibt sich eine Plasmahalbwertszeit ($t_{1/2}$) von 102,1 min bzw. 102,4 min für die wiederholte Injektion nach 7 bzw. 14 Tagen (vgl. Tabelle 18). Die Plasmahalbwertszeit ($t_{1/2}$) erhöht sich bei Injektion von 5 mg/kg am Tag 0 bei einer Plasmakonzentration von $142,3 \pm 25,57$ µg/ml, $134,9 \pm 23,64$ µg/ml bzw. $100,5 \pm 16,93$ µl/ml nach 2 min, 10 min bzw. 90 min auf 165,6 min. Im Bezug auf die errechnete c_{\max} entspricht das 114%, 108% und 80% für die angegebenen Messzeitpunkte. Auf die wiederholte Applikation von TSL(Dox) 5 mg/kg wurde verzichtet, da zwei von vier Ratten am Tag nach dem ersten Experiment verstarben.

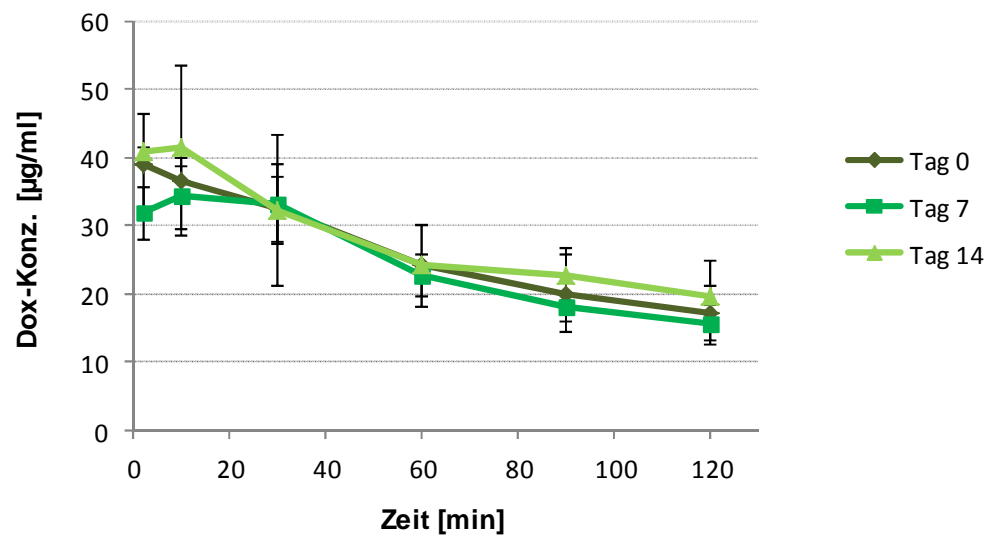


Abbildung 14 - Dox-Plasmakonzentrationskurve; TSL(Dox) 2 mg/kg Tag 0 (n = 7) mit wiederholter Injektion an Tag 7 (n = 3) bzw. Tag 14 (n = 3)

	Dosis [mg/kg]	c ₂ [µg/ml]	t _{1/2} [min]	R ²	AUC _{0-120 min} [µg*min/ml]	n
Tag 0	5	142,3	165,6	0,97482	13140	4
Tag 0	2	39,2	96,8	0,9942	3085	7
Tag 7	2	31,8	102,1	0,9296	2756	3
Tag 14	2	40,8	102,4	0,9864	3312	3

Tabelle 18 - Dox-Plasmakonzentration; Injektion von 2 bzw. 5 mg/kg TSL(Dox); wiederholte Applikation von TSL(Dox) 2 mg/kg nach 7 bzw. 14 Tagen; c₂ = Konzentration 2 min nach Injektion, t_{1/2} = Plasmahalbwertszeit (t_{1/2}), R² = Grad der Bestimmtheit (engl. coefficient of determination), AUC_{0-120 min} = Fläche unter der Plasmaspiegelkurve 0-120 min (engl. Area under the curve)

TSL(Gem)-Stabilität im Plasma der F344 Ratte

Abbildung 15 zeigt die Plasmakonzentration nach i.v.-Verabreichung von 6 mg/kg TSL(Gem) über einen Zeitraum von 120 min. Die errechnete c_{max} bei dieser Dosis beträgt 150 µg/ml. Die gemessene Plasmakonzentration 2 bzw. 10 min nach Injektion liegt bei 178,4 ± 9,35 µg/ml bzw. bei 164,7 ± 14,73 µg/ml. Das sind 119% bzw. 110% der c_{max}. Die Liposomen zeigten sich stabil

über den gesamten Beobachtungszeitraum. Nach 60 min bzw. 120 min wurde eine Gem-Konzentration von $128,0 \pm 14,07 \mu\text{g/ml}$ bzw. $103,9 \pm 9,38 \mu\text{g/ml}$ gemessen. Dies entspricht 71% bzw. 58% der nach 2 min gemessenen Konzentration und 85% bzw. 69% von c_{max} .

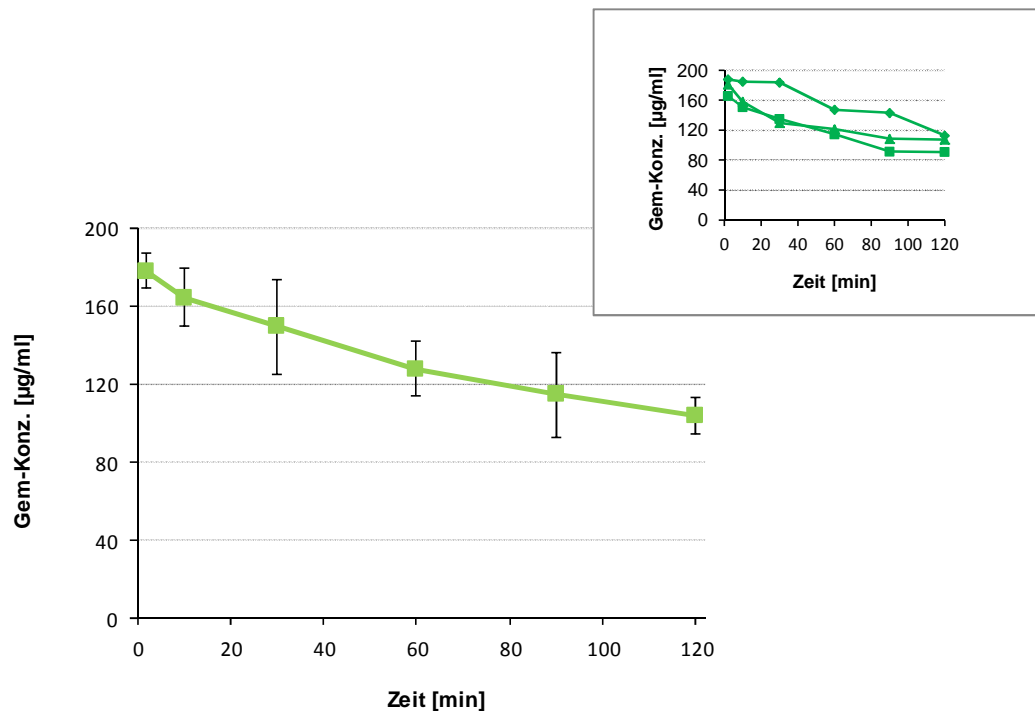


Abbildung 15 - Gem-Plasmakonzentrationskurve; TSL(Gem) 6 mg/kg i.v. (n=3)

	Dosis [mg/kg]	c_2 [µg/ml]	$t_{1/2}$ [min]	R^2	$AUC_{0-120 \text{ min}}$ [µg*min/ml]	n
TSL(Gem)	6	178,4	149,4	0,98375	15780	3

Tabelle 19 - Gem-Plasmakonzentration nach i.v.-Applikation von 6 mg/kg TSL(Gem);

c_2 = Konzentration 2 min nach Injektion, $t_{1/2}$ = Plasmahalbwertszeit ($t_{1/2}$), R^2 = Grad der Bestimmtheit (engl. *coefficient of determination*), $AUC_{0-120 \text{ min}}$ = Fläche unter der Plasmaspiegelkurve 0-120 min (engl. *Area under the curve*)

5.3.2 Therapiestudie Gemcitabin

In der Studie wurde die therapeutische Wirkung des liposomalen und nicht-liposomalen Gem mit und ohne Anwendung von HT getestet. Vier der fünf Gruppen wurden 6 mg/kg der Gem-Formulierungen i.v. injiziert. Die Ratten der unbehandelten Kontrollgruppe bekamen eine i.v. Injektion mit physiologischer Kochsalzlösung und eine einstündige HT-Behandlung durch Erwärmung auf 41 °C mit einer Lampe (siehe Abbildung 6). Zwei Gruppen wurden mit nicht-liposomalem Gem behandelt. Davon wurde eine Gruppe ohne, die andere Gruppe mit HT behandelt. Von den drei Gruppen, denen TSL(Gem) appliziert wurde, bekam eine Gruppe keine HT-Behandlung, bei der zweiten Gruppe wurde der Tumor lokal mit der Lampe auf 41 °C erwärmt. Die dritte Gruppe bekam eine regionale HT der gesamten tumortragenden Hintergliedmaße auf 42°C im Wasserbad. Bei Tieren, die mit HT behandelt wurden, wurde der Wirkstoff erst injiziert, nachdem der Tumor die Zieltemperatur erreicht hatte.

Im Gegensatz zur mit HT und physiologischer Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe wurde in den mit Gem behandelten Gruppen eine Wachstumsverzögerung des Tumors beobachtet. Vergleichbar mit den Ergebnissen aus den Zellkulturexperimenten (siehe Abbildung 9, vgl. Tabelle 14) brachte eine kombinierte Behandlung aus nicht-liposomalem Gemcitabin und HT keine Steigerung der zytotoxischen Effektivität im Vergleich mit einer alleinigen Injektion von nicht-liposomalem Gem. Eine signifikante Verbesserung der Therapieeffizienz wurde durch die lokale HT mit der Lampe erreicht. Sowohl im Vergleich mit nicht-liposomalem Gem -HT ($p < 0,05$) und +HT ($p < 0,01$) als auch mit TSL(Gem) -HT ($p < 0,01$) ist das Tumorwachstum bei TSL(Gem) +HT Lampe behandelten Tieren deutlich verringert. Die Gruppe, die mit TSL(Gem) +HT Wasserbad behandelt wurde, zeigte eine geringere Tumorwachstumsverzögerung als alle anderen liposomal behandelten Gruppen (siehe Abbildung 16).

Zwei von sechs Tieren aus der TSL(Gem) -HT behandelten Gruppe entwickelten krustige, schuppige Schwanzläsionen 6 bzw. 14 Tage nach der

Behandlung. Weitere Toxizitäten wurden nicht beobachtet (siehe Abbildung 16, Foto).

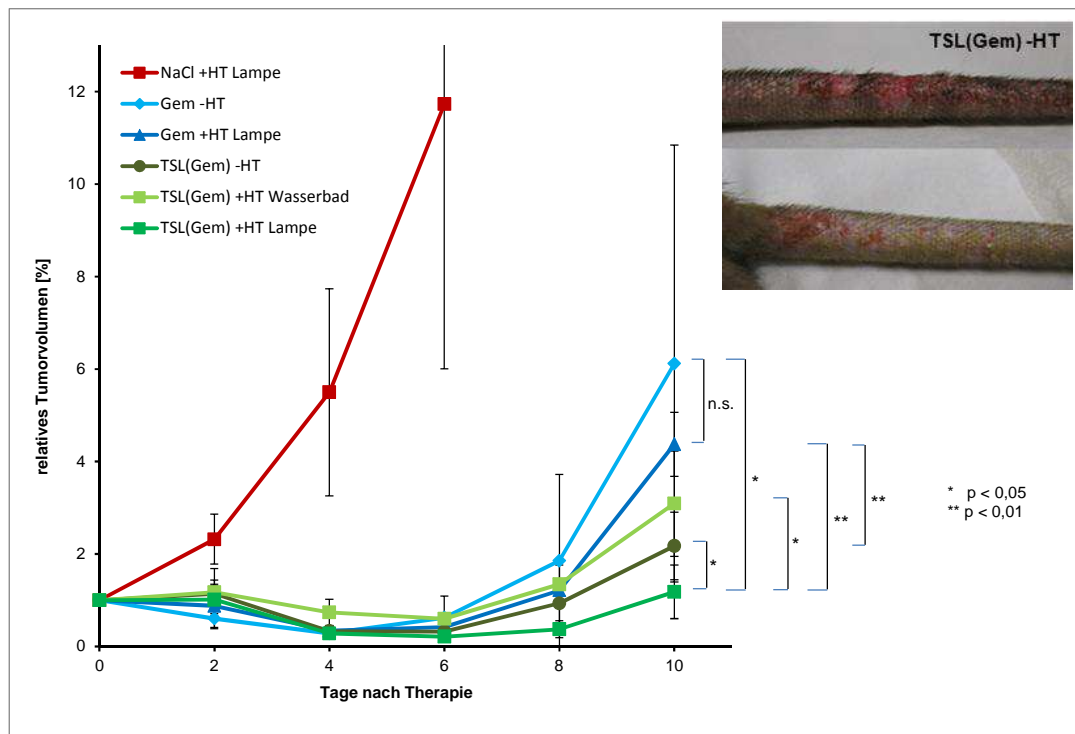


Abbildung 16 - Tumorzustandsstudie Weichteilsarkom BN175; Behandlung mit 6 mg/kg Gem i.v +/- HT; alle Gruppen n = ≥6 außer TSL(Gem) + HT Wasserbad n = 3; Foto: Hautläsionen nach Behandlung mit TSL(Gem) - HT;

5.3.3 Etablierung Blasenkarzinom-Modell

Generierung und Kontrolle Tumorzustand

Xiao et al. etablierten die generalisierte chemische Behandlung der Rattenblase und generierten ein multifokales Tumorzustand durch Tumorzellinstillation [63]. Von Hendricksen et al. wurde die zystoskopische Evaluierung des Tumorzustands nach generalisierter chemischer Behandlung und Tumorzellinstillation beschrieben [57]. In den durchgeführten Vorversuchen wurden diese Angaben als Richtlinien herangezogen. Fünf Tage nach Tumorzellinstillation fiel inguinal palpatorisch eine derbe, ca. 1x1 cm große Umfangsvermehrung auf. Bei der

Blasenspülung im Anschluss an die Katheterisierung konnte nur eine geringe Menge an Spülflüssigkeit in die Blase eingebracht werden. Dies deutete bereits auf ein stark eingengtes Blasenlumen hin. Zystoskopisch war keine Bildgebung möglich. Nach Euthanasie des Tieres, Entnahme und Eröffnung der Blase konnte festgestellt werden, dass nahezu das gesamte Blasenlumen mit proliferativem Gewebe ausgefüllt war.

Um solitäres, lokal definiertes Tumorwachstum zu generieren, beschrieben El Kathib et al. die Erzeugung eines punktuellen Epitheldefekts durch lokale chemische Behandlung mittels eines in Säure bzw. Lauge getränkten Mikro-Tupfers [56] mit anschließender generalisierter Tumorzellinstillation. Ein lokaler Tumor erleichtert die Evaluierung des Tumorwachstums und verzögert das Voranschreiten der Tumorausbreitung. Dies verspricht ein deutlich breiteres therapeutisches Fenster. In den Versuchen konnten mit dieser Methode einzelne, lokale Tumoren erzeugt werden, die sich vier oder spätestens fünf Tage nach erfolgter lokaler Behandlung und Tumorzellinstillation zystoskopisch als Raumforderungen darstellen ließen. Sieben Tage nach der Tumorgenerierung waren zystoskopisch ein oder mehrere ins Lumen der Blase reichende Knoten deutlich erkennbar (siehe Abbildung 17). Auch makroskopisch wurden an der eröffneten Blase Befunde von mehreren knotigen Veränderungen bis hin zu einzelnen größeren Gewebemassen erhoben (siehe Abbildung 18). Bei der mikroskopischen Untersuchung von histologischen Schnitten wurde Gewebe mit ungeordneter Struktur und vermehrten Mitosen, vergrößerten, polymorphen Zellen und pleomorphen Kernen festgestellt (siehe Abbildung 19). Der Tumor wurde als pT1G3 klassifiziert.

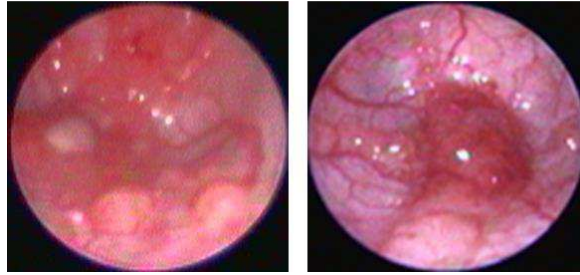


Abbildung 17 - Zystoskopie Blase; Umfangsvermehrung sieben Tage nach AY27-Tumorzellinstillation

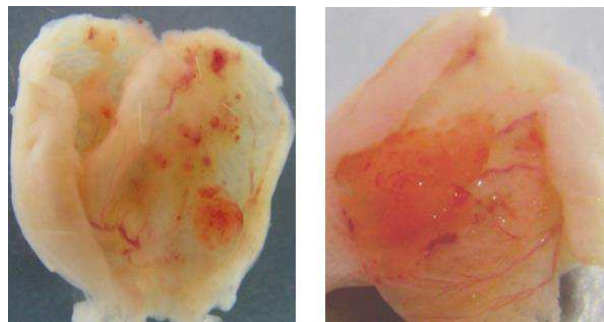


Abbildung 18 - Makroskopisch erkennbare Umfangsvermehrungen in der eröffneten Rattenblase; sieben Tage nach AY27-Tumorzellinstillation

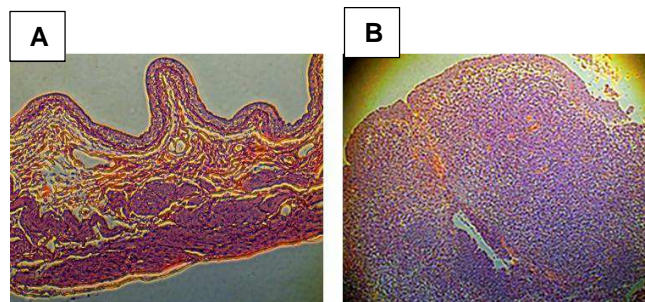


Abbildung 19 - Histologie Blase F344 Ratten; (A) unauffällige Blasenschleimhaut (x10); (B) pT1G3 Tumor sieben Tage nach Tumorzellinstillation (x10)

Hyperthermie Blase

Die Zielsetzung war, eine Methode zu entwickeln, die es zulässt, unter möglichst einfachen Laborbedingungen eine Rattenblase über einen Zeitraum von 1 h konstant auf 41 °C zu erwärmen. Eine wie zuvor unter 4.3.5 (siehe Abbildung 7, Abbildung 20) beschriebene Erwärmung mit Licht war aufgrund der anatomischen Lage der Blase nicht möglich. Die Überlegung war, die Blase durch kontinuierliche Spülung mit Flüssigkeit aus einem Wasserbad, auf 41 °C zu erwärmen. Der erste Ansatz war, über eine suprapubische Punktion der Blase erwärmte physiologische Kochsalzlösung in das Lumen zu leiten und überschüssiges Wasser über einen Blasenkatheter ablaufen zu lassen. Eine sichere Punktion der Blase ohne Ultraschallkontrolle und die Gewährleistung, dass die Punktionsnadel über die Dauer der Behandlung in der Blase verbleibt, wären Voraussetzungen für die Durchführung dieser Behandlungsmethode gewesen. Außerdem hätte nicht kontrolliert werden können, ob an der Punktionsstelle Flüssigkeit in die Bauchhöhle austritt. Bei geschlossener Bauchdecke konnte dies nicht beurteilt werden. Es wurde davon abgesehen, den Versuch invasiver zu gestalten und dies durch Eröffnung der Bauchhöhle zu beobachten.

Deshalb wurde die unter 4.3.6 beschriebene Methode angewendet. Es war möglich, zwei Katheter in der Blase zu platzieren. Über den 24 G Katheter konnte eine Rollerpumpe mit einem Fluss von 550 ml/h auf 51 °C erwärmter physiologischer Kochsalzlösung über ein Schlauchsystem in die Blase geleitet werden. Der zweite, mit 18G etwas größere Katheter, ermöglichte das Abfließen der Lösung und verhinderte, dass die Blase überdehnt wurde.

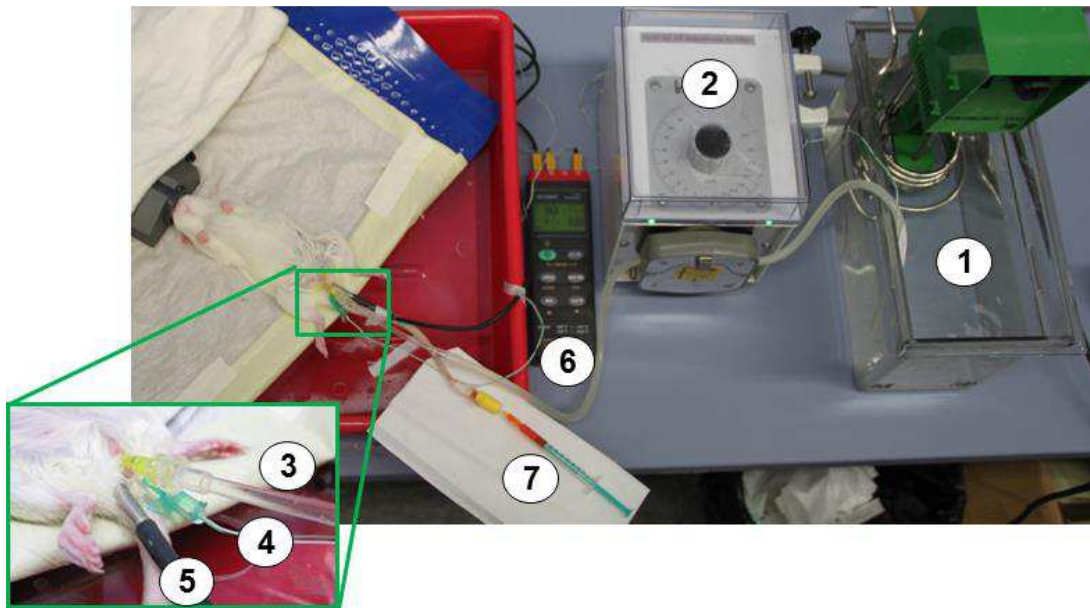


Abbildung 20 - Aufbau HT-Behandlung Blase; 1 Wasserbad, 2 Peristaltikpumpe, 3 Katheter für zulaufende Flüssigkeit, 4 Katheter für ablaufende Flüssigkeit mit Temperatursonde, 5 Rektalsonde, 6 Temperaturmessgerät, 7 i.v. Injektion *V. coccygea lateralis*

Temperaturen von 41 °C im abfließenden Wasser wurden als Zieltemperatur im Inneren der Blase gewertet. Durch den kontinuierlichen Fluss der Pumpe war es möglich, die Zieltemperatur über die gesamte Dauer der Behandlung konstant zu halten (siehe Abbildung 21). Tiere, die auf diese Weise einer Hyperthermie der Blase unterzogen wurden, wurden im Anschluss an die Behandlung 14 Tage überwacht. Dies umfasste die Protokollierung von Verhaltensauffälligkeiten, von Wasser- und Futteraufnahme sowie Urinabsatzbeschwerden oder Hämaturie. Es wurden keine negativen Auswirkungen der Behandlungsmethode auf das Allgemeinbefinden der Tiere festgestellt.

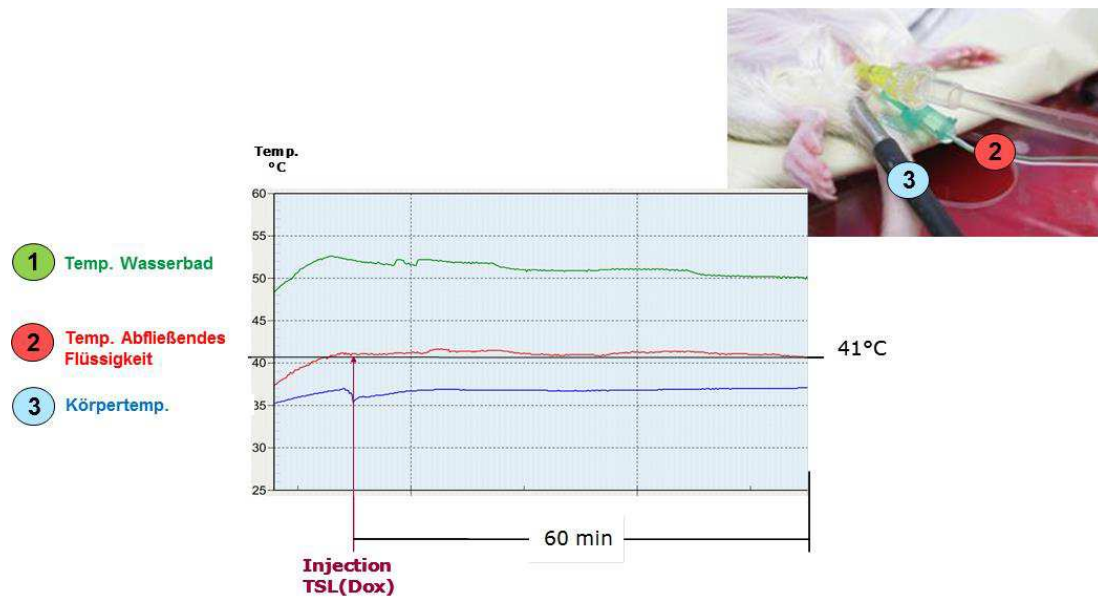


Abbildung 21 - Temperaturkontrolle HT Blase; 1 Temperatur Wasserbad, 2 Temperatur in abfließender Flüssigkeit, 3 Körpertemperatur

5.3.4 Anreicherungsstudie und Organverteilung

Im Folgenden wurde die konventionell angewendete intravesikale Chemotherapie der systemischen, zielgerichteten Therapie mit TSL und Hyperthermie gegenübergestellt. Als Kontrolle diente die systemische Therapie mit nicht liposomalem Wirkstoff in Kombination mit Hyperthermie. Die Proben wurden im Anschluss an die einstündige Behandlung entnommen.

Organe

Die höchsten Dox-Konzentrationen 1 h nach Dox Injektion wurden in der Milz ($58,96 \pm 6,57$ ng/mg) und der Leber ($24,29 \pm 3,23$ ng/mg) bei Tieren, die systemisch mit 5 mg/kg TSL(Dox) in Kombination mit HT der Blase behandelt wurden, festgestellt. Bei Tieren, die systemisch mit 5 mg/kg mit nicht-liposomalem Dox und HT der Blase behandelt wurden, konnten in der Milz $42,06 \pm 7,44$ ng/mg und Leber $17,40 \pm 5,51$ ng/mg Dox nachgewiesen werden. Nach intravesikaler Therapie mit 5 mg/kg Dox waren die Konzentrationen in der Milz ($10,44 \pm 4,38$ ng/mg) um das 4-5-fache und in der Leber (6,07 ng/mg) um das 3-4-fache niedriger. Bei einer intravesikalen

Therapie mit 0,5 mg Dox/Tier wurden in Milz bzw. Niere Konzentrationen von $1,58 \pm 0,92$ ng/mg bzw. $1,10 \pm 0,69$ ng/mg gemessen (siehe Abbildung 22, Abbildung 23).

In der Niere waren die gemessenen Dox-Konzentrationen mit $26,45 \pm 5,17$ ng/mg und $26,80 \pm 3,62$ ng/mg bei liposomal und nicht-liposomal verabreichtem Dox gleich hoch. Nach intravesikaler Chemotherapie mit 5 bzw. 0,5 mg/kg Dox wurden in der Niere $10,70 \pm 4,32$ ng/mg bzw. $15,98 \pm 0,54$ ng/mg festgestellt. Diese Werte entsprechen 40% bzw. 60% der Konzentration, die auch bei systemischer Dox-Verabreichung in der Niere gemessen wurde (siehe Abbildung 24).

Im Herzen war die Konzentration bei 5 mg/kg systemisch verabreichtem nicht-liposomalem Dox +HT mit $12,64 \pm 2,25$ ng/mg am höchsten. Bei der Behandlung mit 5 mg/kg liposomalem Dox wurden $8,40 \pm 1,76$ ng/mg Dox im Herzen festgestellt, während bei gleicher Dosis bei intravesikaler Therapie mit nicht eingeschlossenem Wirkstoff nur $2,53 \pm 0,87$ ng/mg Dox im Gewebe des Herzens nachgewiesen wurden. Im Vergleich zur systemischen Behandlung mit nicht liposomalem Dox entspricht der Anteil von der gemessenen Konzentration 66% bei TSL(Dox) +HT und 20% bei intravesikaler Behandlung (siehe Abbildung 25).

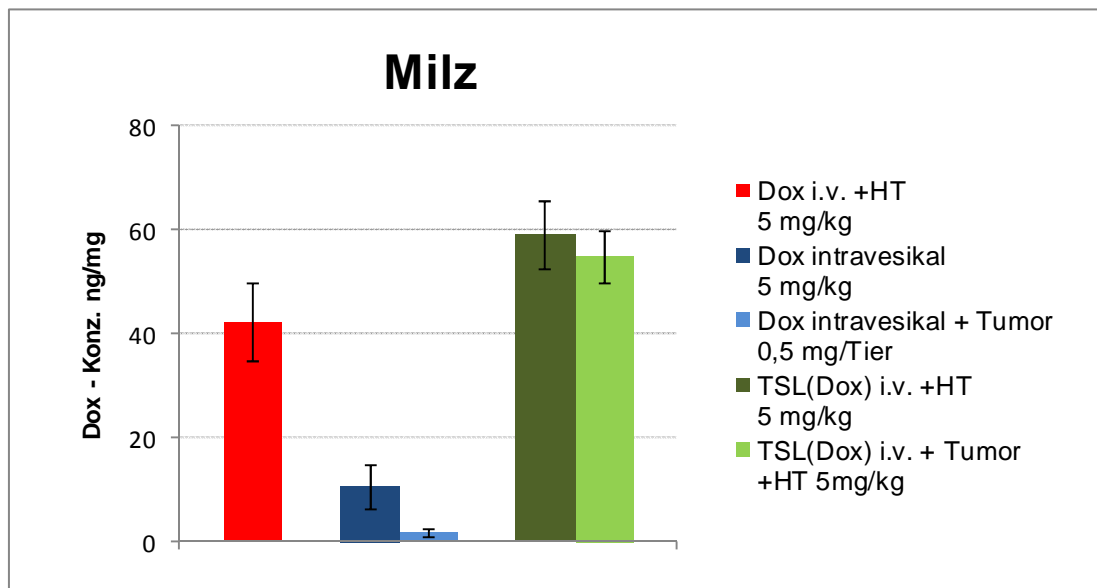


Abbildung 22-Dox-Konzentration in der Milz; nach einstündiger Behandlung mit nicht-liposomalem Dox bzw. TSL(Dox) i.v. + HT Blase oder einstündiger Behandlung mit nicht-liposomalem Dox intravesikal -HT

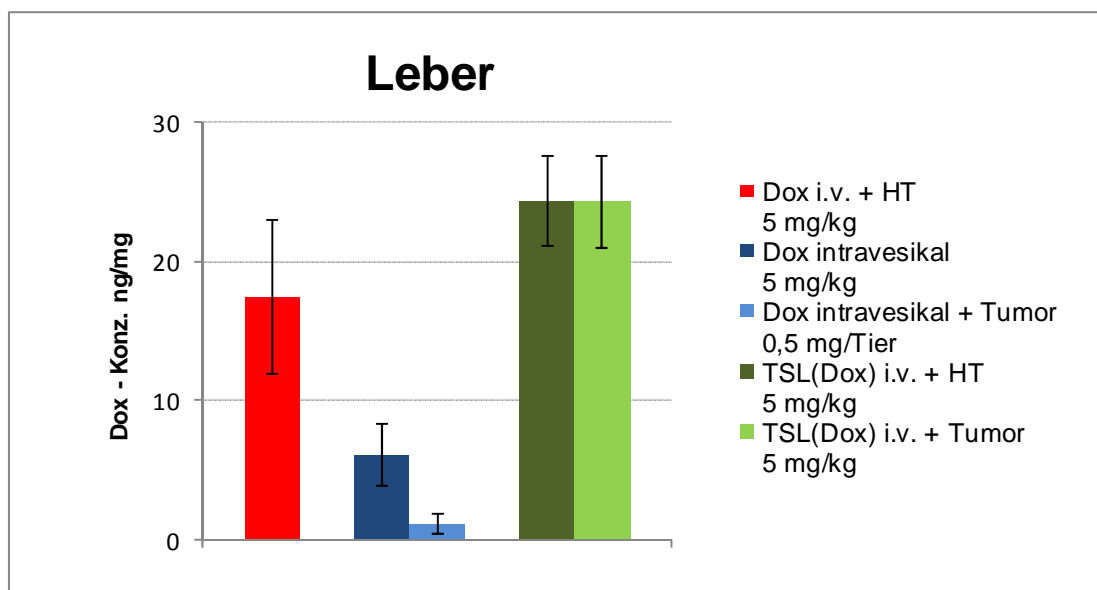


Abbildung 23 -Dox-Konzentration in der Leber; nach einstündiger Behandlung mit nicht-liposomalem Dox bzw. TSL(Dox) i.v. + HT Blase oder einstündiger Behandlung mit nicht-liposomalem Dox intravesikal -HT

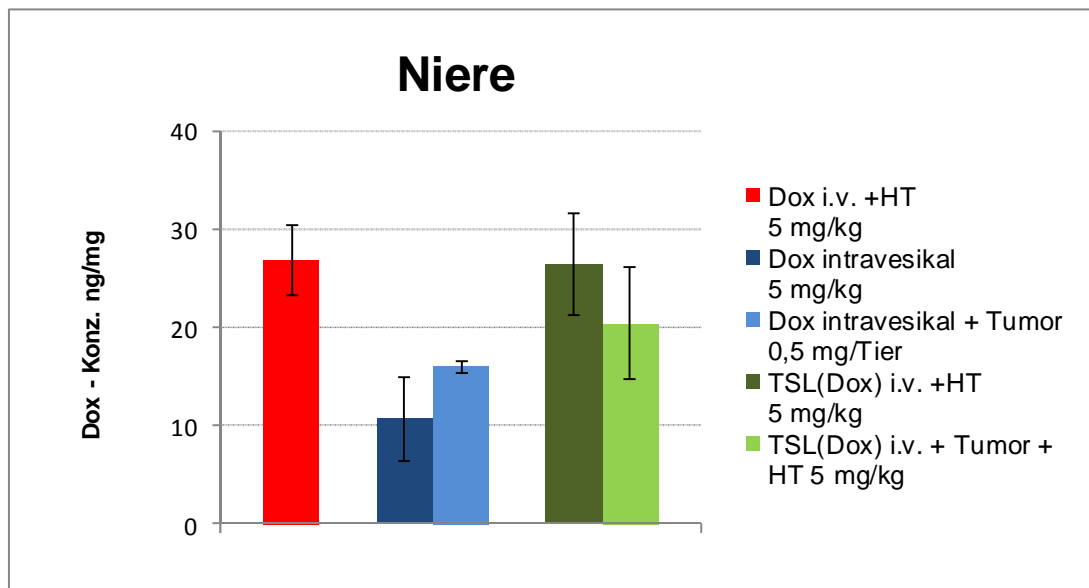


Abbildung 24 - Dox-Konzentration in der Niere; nach einstündiger Behandlung mit nicht-liposomalem Dox bzw. TSL(Dox) i.v. + HT Blase oder einstündiger Behandlung mit nicht-liposomalem Dox intravesikal -HT

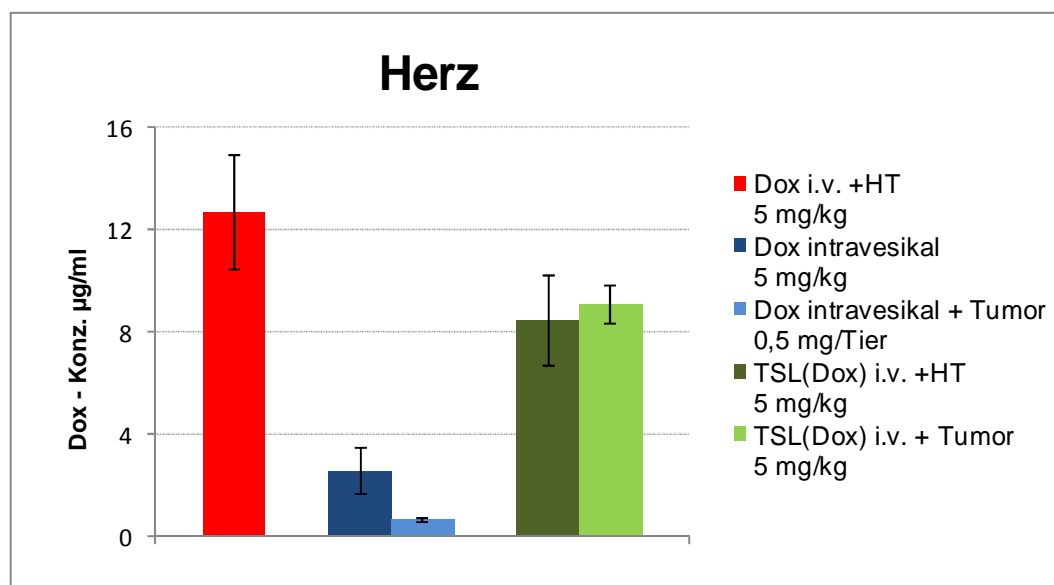


Abbildung 25 - Dox-Konzentration im Herzen; nach einstündiger Behandlung mit nicht-liposomalem Dox bzw. TSL(Dox) i.v. + HT Blase oder einstündiger Behandlung mit nicht-liposomalem Dox intravesikal -HT

Blase

Die höchsten Wirkstoff-Konzentrationen wurden bei der intravesikalen Therapie mit 5 mg/kg Dox sowohl im Urothel ($361,04 \pm 83,15$ ng/mg) als auch in der *Tunica muscularis* ($289,77 \pm 129,37$ ng/mg) erreicht. 80% der Wirkstoffkonzentration, die in der Schleimhaut nachgewiesen wurde, konnte auch in der *Tunica muscularis* gemessen werden. Nach der Entnahme der Blase wurde bei vier von sieben Blasen eine lokale Orangefärbung der Schleimhaut, teilweise auch der *Tunica muscularis*, mit einer geringen bis mittelgradigen Rötung beobachtet. Drei von sieben Rattenblasen zeigten eine generalisierte hochgradige Rötung der Schleimhaut mit Hämorrhagien, teilweise Ödematisierung oder auch Orangefärbung des Gewebes in der gesamten Blasenwand (siehe Abbildung 29). Bei gleicher Dosis wurden bei systemischer Behandlung mit TSL(Dox) kombiniert mit HT-Blase im Urothel $119,20 \pm 19,02$ ng/mg und in der *Tunica muscularis* $54,30 \pm 25,01$ ng/mg Dox nachgewiesen. Bei der Entnahme der Blase wurde keine Toxizität festgestellt (siehe Abbildung 29). Die Wirkstoffkonzentration in der *Tunica muscularis* entsprach 45% der im Urothel gemessenen Wirkstoffkonzentration. Bei i.v.-Applikation von 5 mg/kg nicht-liposomalem Dox und HT der Blase betrug die Konzentration im Urothel $10,24 \pm 6,12$ ng/mg und in der *Tunica muscularis* $5,14 \pm 2,93$ ng/mg (siehe Abbildung 26).

Aufgrund der beobachteten Toxizität bei der intravesikalen Therapie mit 5 mg/kg Dox wurde die Dosierung in Anlehnung an die reduzierte intravesikale Dosis beim Menschen (systemisch 50-80 mg/m² Körperoberfläche i.v., intravesikal 30-50 mg gelöst in 25-50 ml physiologischer Kochsalzlösung) auf 0,5 mg/Tier reduziert [64]. Die Dox-Konzentrationen im Urothel bzw. in der *Tunica muscularis* betrugen bei dieser Dosierung $91,73 \pm 50,38$ ng/mg bzw. $15,40 \pm 18,19$ ng/mg. Daraus folgt, dass nur noch 17% der im Urothel nachgewiesenen Wirkstoffkonzentration in die *Tunica muscularis* gelangte. Bei Vorhandensein von intravesikalem Tumorgewebe reduzierte sich die gemessene Konzentration im Urothel auf $37,02 \pm 26,86$ ng/mg und in der *Tunica muscularis* auf $7,97 \pm 6,50$ ng/mg. Beim Vergleich der bereits angegebenen Werte bei der Behandlung von 5 mg/kg TSL(Dox) +HT ohne Tumor mit den

Werten, die bei der Vergleichsgruppe mit Blasentumor gemessen wurden (Urothel $102,18 \pm 24,71$ ng/mg, *Tunica muscularis* $40,51 \pm 10,93$ ng/mg), werden 86% und 75% der Konzentration des Wirkstoffs in Urothel und *Tunica muscularis* der Gruppe der Tiere mit gesunder Blase erreicht (siehe Abbildung 28). Bei einer Dosis von 0,5 mg/Tier TSL(Dox) i.v. mit HT der Blase ergaben die Messungen im *Urothel* $47,51 \pm 32,26$ ng/mg und in der *Tunica muscularis* $17,89 \pm 5,08$ ng/mg Dox. Die Dox-Konzentration im Blasenmuskel betrug 38% der Konzentration, die im Urothel gemessen wurde (siehe Abbildung 27, Abbildung 28).

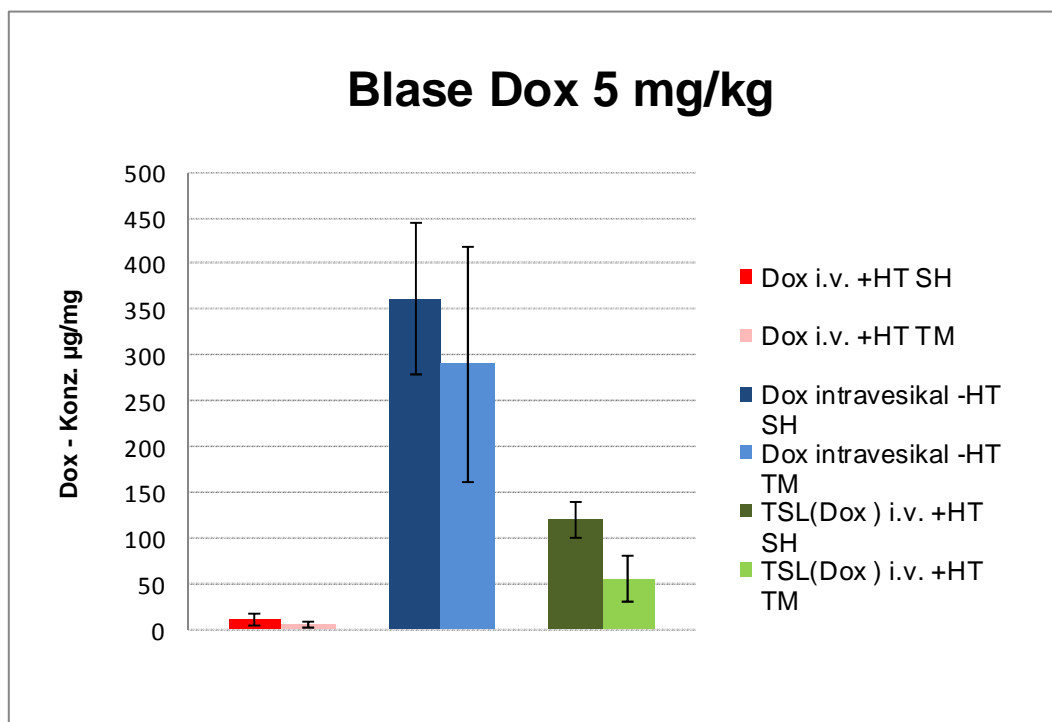


Abbildung 26 - Dox-Konzentration im Urothel (SH) und in der *Tunica muscularis* (TM) der Blase ohne Tumor; einstündige systemische oder intravesikale Therapie, 5 mg/kg nicht-liposomales Dox oder TSL(Dox) ±HT Blase

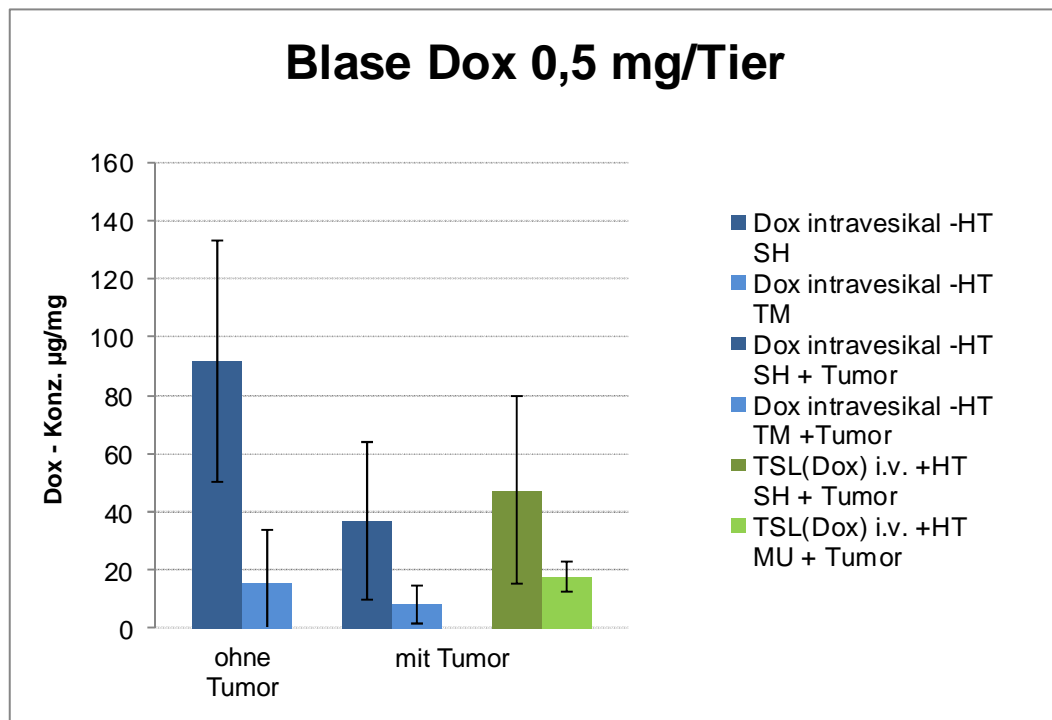


Abbildung 27 - Dox-Konzentration im Urothel (SH) und in der *Tunica muscularis* (TM) der Blase ± Tumor; einstündige systemische oder intravesikale Therapie, 5 mg/kg nicht-liposomales Dox –HT oder TSL(Dox) +HT Blase

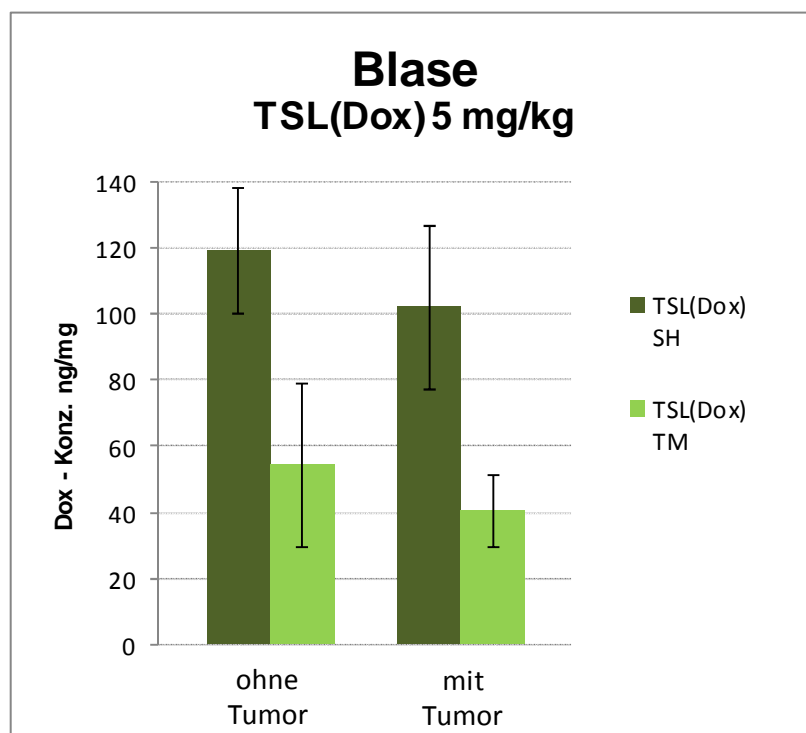


Abbildung 28 - Dox-Konzentrationen im Urothel (SH) und in der *Tunica muscularis* (TM) der Blase ± Tumor; 5 mg/kg TSL(Dox) i.v. +HT

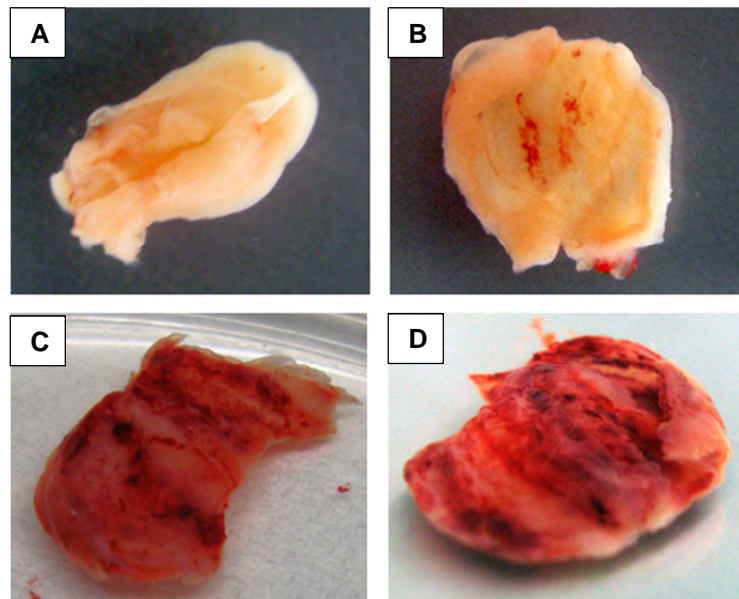


Abbildung 29 - Blase F344 Ratte; Therapie mit 5 mg/kg Dox;

A Aufsicht auf intakte bzw. **B** eröffnete Blase nach einstündiger HT mit 5 mg/kg TSL(Dox) i.v.; **C** Aufsicht auf intakte bzw. **D** eröffnete Blase nach einstündiger intravesikaler Therapie mit 5 mg/kg nicht-liposomalem Dox

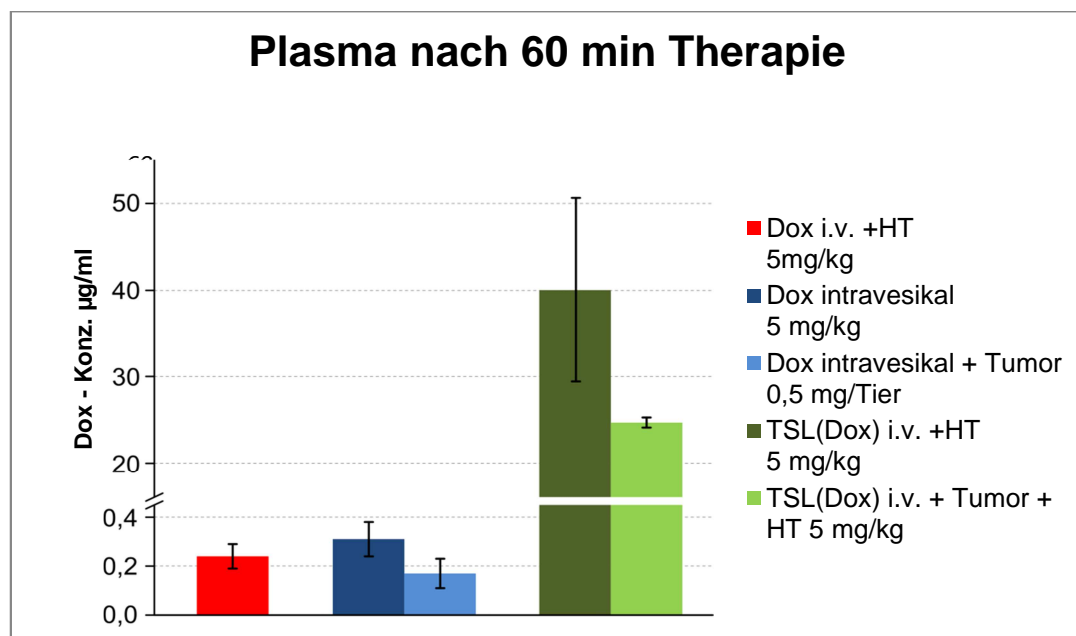


Abbildung 30 - Dox-Konzentration im Plasma; nach einstündiger Behandlung mit nicht-liposomalem Dox bzw. TSL(Dox) i.v. + HT Blase, oder einstündiger Behandlung mit nicht-liposomalem Dox intravesikal -HT

Plasma

Nach einer einstündigen Behandlung wurde bei mit nicht-liposomalem Dox therapierten Gruppen nur wenig Dox im Plasma nachgewiesen. Bei systemischer bzw. intravesikaler Chemotherapie mit 5 mg/kg Dox betrug die messbare Plasmakonzentration $0,24 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$ bzw. $0,31 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$. Bei der Therapie mit TSL(Dox) +HT mit bzw. ohne intravesikalem Tumor betrugen die Plasmakonzentrationen 1 h nach der Injektion $40,04 \pm 10,61 \mu\text{g/ml}$ bzw. $24,69 \pm 0,58 \mu\text{g/ml}$ (siehe Abbildung 30).

6 Diskussion

TSL bieten die Möglichkeit einer wärmeinduzierten, zielgerichteten Chemotherapie. Der im Inneren eingeschlossene Wirkstoff ist vor Metabolisierungsvorgängen im Körper geschützt und kann ungehindert das Zielgewebe erreichen. Außerdem schützt die liposomale Membran gesundes Gewebe vor den toxischen Einflüssen des Wirkstoffs und reduziert damit die schädlichen Nebenwirkungen. Langzirkulierende Liposomen erreichen durch Verlängerung der Plasmahalbwertszeit und passive Anreicherung aufgrund des EPR-Effekts höhere Wirkstoffkonzentrationen im Tumorgewebe als bei der Therapie mit nicht-liposomalem Wirkstoff. Allerdings ist dieser aufgrund der stabilen Membran nicht vollständig bioverfügbar und somit nicht zytotoxisch wirksam [10]. TSL erreichen durch zielgerichtete intravasale Wirkstofffreisetzung lokal 5-10-fach höhere bioverfügbare Zytostatikakonzentrationen [44].

Die auf dem synthetischen Lipid DPPG₂ basierenden TSL haben zum Einen den Vorteil einer langen Zirkulationszeit [12, 37] und zum Anderen, in Kombination mit HT, den einer schnellen Wirkstofffreisetzung [17]. Damit hat diese Formulierung großes Potential, die Effizienz der Chemotherapie mit routinemäßig eingesetzten Zytostatika zu verbessern. In dieser Arbeit wurden die Wirkstoffe Dox, Gem und Mito in TSL eingeschlossen, diese charakterisiert und der Einsatz der zielgerichteten Behandlung mit TSL mit herkömmlichen Therapiemethoden in zwei Tumormodellen verglichen.

6.1 Zytotoxizitätstest

In Zellkulturexperimenten wurden die für die Versuche vorgesehenen Wirkstoffe auf das Ansprechen der Zellen des Weichteilsarkoms BN175, des Blasenkarzinoms AY27 und des Kolonkarzinoms DHD/K12/TRb sowie der Einfluss der Hyperthermie getestet.

Die Zelllinien BN175 und AY27 zeigten bei den Wirkstoffen Dox und Gem ähnlich niedrige IC_{50} und eignen sich gut für die Therapie *in vivo* (vgl. Tabelle 14, Tabelle 15). Bei Mito war die IC_{50} der BN175 bei 37°C um das 1,8-fache ($31,09 \pm 10,7$ nM), bei 41°C ($35,41 \pm 9,04$ nM) um das 2,0-fache höher als bei den AY27 Zellen (-HT/+HT $17,46 \pm 2,41$ nM/ $17,83 \pm 5,27$ nM). Daraus kann geschlossen werden, dass Mito sich im Blasenkarzinom-Modell der Ratte als sehr potent einsetzbarer Wirkstoff eignen würde. Mito ist auch bei der von Chemotherapie bei Patienten mit Blasenkarzinom, neben der Therapie mit Epirubicin, ein gut wirkendes Zytostatikum und zeigt Vorteile im Vergleich mit Dox und Gem [65].

Beim Kolonkarzinom werden standardmäßig Oxaliplatin, Irinotecan und 5-Fluorouracil eingesetzt. Auch Mito kann bei der Therapie verwendet werden, zählt aber nicht als Erstlinientherapie [66]. DHD/K12/TRb zeigten *in vitro* nur eine mäßige Empfindlichkeit gegenüber Mito. Eine Aussage über eine eventuell gesteigerte Empfindlichkeit durch die Kombination mit HT kann aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht getroffen werden (-HT/+HT, $958,47 \pm 210,86$ nM/ $353,8 \pm 146,5$ nM) (vgl. Tabelle 16, siehe Abbildung 13). Da die Zellen sehr stark verklumpten, ist zu bezweifeln, dass die ausgesäte Zellmenge pro Well gleich war. Dies erklärt auch die Schwankungen der Messergebnisse. Dox wird nicht bei der Therapie des Kolonkarzinoms eingesetzt und erwies sich bei der Zelllinie DHD/K12/TRb als schlecht wirksam (vgl. Tabelle 16). Von den getesteten Zytostatika hatte Gem als einziger Wirkstoff mit einer IC_{50} von $130,81 \pm 33,99$ nM bzw. $107,78 \pm 5,36$ nM bei 37°C bzw. 41 °C eine gute zytotoxische Wirkung (vgl. Tabelle 16).

Der Einfluss von Hyperthermie auf die Zytotoxizität der Chemotherapie ist ein bereits vielfach diskutiertes Thema. Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass sich die Toxizität der Wirkstoffe bei den verwendeten Zelllinien bei simultaner einstündiger HT von 41 °C, bei den verwendeten Zelllinien, gegenüber der Behandlung bei 37°C nicht ändert (siehe Abbildung 10, Abbildung 12, Abbildung 13). In den Experimenten wurde eine Temperatur von 41 °C gewählt, da dies die Zieltemperatur für die wärmeinduzierte Freisetzung *in*

vivo darstellte. An der von Mäusen abstammenden Mammasarkomzelllinie EMT-6 wurde für Dox gezeigt, dass die Temperatur, die HT-Dauer und die Zeitspanne, der die Zellen dem Wirkstoff ausgesetzt sind, Einfluss auf die Zytotoxizität haben [67]. Bei einstündiger HT mit 41 °C und 42 °C ohne Wirkstoff wurde kein Unterschied im Zellüberleben festgestellt. Bei Ausdehnung der Zeitspanne > 1 h zeigte sich für die Zellen ein geringer Rückgang im Überleben. Setzte man die Zellen bei 37 °C unterschiedlich lange 0,5 µg/ml Doxorubicin aus, sank das Überleben bis zu einer Expositionsdauer von 3 h um 10%. Bei gleicher Dosis war nach bis zu 3 h Wirkstoffexposition mit simultaner HT von 41 °C nur eine geringe Steigerung der Zytotoxizität erkennbar. Allerdings sank die Zahl der vitalen Zellen bei drei- und sechsständiger Behandlung auf 80%, im Vergleich mit unbehandelten Zellen. Bei gleicher Dox-Konzentration und 42 °C war das Zellüberleben bei drei- und sechsständiger Behandlung auf 72% bzw. 62% gesunken. Im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen erkennt man den seit vielen Jahren bekannten Zusammenhang zwischen Erwärmungstemperatur und der Dauer der Erwärmung. Auf der Suche nach einer Größe, die diesen Zusammenhang in Relation setzt, publizierten Field et al. 1983, dass bei Temperaturen > 42 °C jede weitere Erhöhung um 1 °C die Erwärmungszeit um den Faktor 2 ändert (z.B. 1 h bei 43 °C entspricht 0,5 h bei 44 °C) [68]. Das Konzept der Thermodoses (engl. *isoeffect thermal dose*) kann die Erwärmungsdauer bei verschiedenen Temperaturen in Erwärmungsminuten bei 43°C konvertieren (engl. *cumulative equivalent minutes at 43°C*) [69]. So ist es möglich, die Thermodoses bei einer Behandlung genau zu bestimmen und einzuhalten. Die Thermodoses für einen zytotoxischen Effekt ist sowohl für jeden Wirkstoff als auch für jede Zelllinie individuell. Außerdem ist sie abhängig von der Phase des Zellzyklus [70].

In Zellkulturexperimenten mit Mito wurde der Einfluss von simultaner, einstündiger HT von 43 °C auf vier Blasenkarzinomzelllinien des Menschen untersucht [71]. Dabei wurde festgestellt, dass die Erwärmung einen synergistischen Effekt auf das Zytostatikum hat. Dieser war bei den untersuchten Zelllinien unterschiedlich stark ausgeprägt.

Bei der Behandlung mit Gem in Kombination mit HT wurde außerdem der Zeitpunkt der Wärmebehandlung als entscheidendes Kriterium für zytotoxische Effekte festgestellt. Untersuchungen von R-1 Rhabdomyosarkomzellen zeigten, dass es bei simultaner Therapie von Gem und HT (43 °C) zu einer verringerten Toxizität des Wirkstoffes kommt [72]. Wird die HT-Behandlung während der ersten oder der vierten Stunde einer vierstündigen Inkubation mit Gem durchgeführt, kommt es zu einer Verringerung der Toxizität im Vergleich zur Behandlung mit Gem -HT (37 °C). Verantwortlich gemacht wird eine wärmebedingte Inhibition der Aktivierung (Phosphorylierung) von Gem in die aktiven Metabolite [73]. Wird im Anschluss an die Gem-Inkubation allerdings 19 h gewartet, bevor mit der HT-Behandlung (60 min, 43 °C) begonnen wird, kommt es zu einer signifikanten Steigerung der toxischen Wirkung. Vermutet wird, dass dies aufgrund einer Hemmung der DNA-Reparaturmechanismen geschieht [72]. Gem hemmt die DNA-Synthese und die DNA-Replikation durch Inkorporation von Gemcitabintriphosphat [23]. Durch das Ausbleiben der DNA-Reparatur kommt es zum Zellzyklus-Arrest und schließlich zur Einleitung der Apoptose. In gegenüber Gem chemoresistenten Zelllinien wurde eine dosisabhängige Aktivierung von NF-κB festgestellt [22]. Es wird vermutet, dass durch die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors die Apoptose gehemmt wird. An zwei humanen Pankreaskarzinomzelllinien (AsPC-1, MIAPaCa-2) wurde festgestellt, dass durch HT Behandlung (1h, 43 °C) die NF-κB Aktivierung abgeschwächt wird [74]. HSP70 und HSP32 werden durch HT induziert. Daher wird vermutet, dass diese Proteine eine entscheidende Rolle in der NF-κB Inhibition spielen. Ein Zytotoxizitätstest mit Gem +HT (1 h, 43 °C) 24 h vor, simultan, 24 h oder 48 h nach Wirkstoffzugabe zeigte, dass bei der HT-Vorbehandlung die zytotoxische Wirkung am effektivsten war. Untersuchungen ergaben, dass 3 h nach der HT-Behandlung die HSP Expression induziert wurde und dies 72 h lang anhielt. Daher wird vermutet, dass eine HT-bedingte HSP-Expression die Gem induzierte NF-κB Aktivierung hemmt. Dies führt zu vermehrter Apoptose aufgrund von Zell-Arrest, bedingt durch ausbleibende DNA-Reparatur.

Eine simultane, einstündige HT-Behandlung bei 41 °C hatte keine synergistische oder inhibitorische Wirkung auf die verwendeten Wirkstoffe in den getesteten Zelllinien (siehe Abbildung 10, Abbildung 12, Abbildung 13). Wie beschrieben ist die zytotoxische Wirkung von der Thermodosierung abhängig. Eine einstündige HT-Behandlung bei 41°C hat keinen Effekt auf die Zelllinien BN175, AY27 und DHD/K12/TRb bei Inkubation mit Dox, Gem oder Mito. Allerdings könnte eine Temperaturerhöhung, eine Verlängerung der HT-Dauer oder, wie für Gem beschrieben, die Änderung des Zeitpunkts der Erwärmung einen HT-Effekt induzieren. Gem zeigte bei simultaner Erwärmung keine verringerte zytotoxische Wirkung. Auch dafür kann die niedrige Thermodosierung verantwortlich gemacht werden. Für die Durchführung der *in-vivo*-Versuche ist das Erzielen eines HT-Effekts allerdings nicht erforderlich. Somit kann in den weiteren Experimenten davon ausgegangen werden, dass Vorteile ausschließlich durch wärmeinduzierte zielgerichtete Wirkstofffreisetzung aus TSL erreicht wurden.

6.2 Liposomencharakterisierung TSL(Mito)

Über den passiven Einschluss gelang es, Mito in Liposomen einzuschließen. Allerdings war die Einschlusseffizienz sehr gering. Das Wirkstoff/Lipid-Verhältnis betrug für die hergestellten Chargen $1,56 \times 10^{-3}$ (mol/mol) und $2,97 \times 10^{-3}$ (mol/mol) (vgl. Tabelle 13). Im Vergleich dazu haben die in den Versuchen verwendeten TSL(Gem) bzw. TSL(Dox) ein Wirkstoff/Lipid-Verhältnis von $0,14 \pm 0,03$ (mol/mol) bzw. $0,15 \pm 0,02$ (mol/mol) (vgl. Tabelle 6). Das Verhältnis von Wirkstoff/Lipid ist bei den TSL(Gem) um 128 mal bzw. 96 mal höher und bei den TSL(Dox) 67 mal bzw. 50 mal. Aufgrund der geringen Konzentration des zum Einschluss verwendeten Mitomycin medac® (1 mg/ml) konnte bei einem passiven Einschluss, der über eine gleichmäßige Wirkstoffverteilung im Intra- und Extravesikulärraum geschieht, keine höhere intraliposomale Konzentration erreicht werden. Das intravesikuläre Volumen ist verglichen mit dem extravesikulären Volumen kleiner. Bei einer gleichmäßigen Verteilung von Mito im Gesamtvolumen ist die Menge im Liposom daher gering. Für den passiven Einschluss in Liposomen wurde

eine maximale Einschlusseffizienz von 3-10% beschrieben [12]. Würde man mit Reinsubstanz eine Stammlösung herstellen wollen, die höher konzentriert ist, müsste man die pH-abhängige Löslichkeit beachten. Physiologische Kochsalzlösung hat einen pH von 7,5. Die theoretisch errechnete Löslichkeit bei Raumtemperatur und pH 7 liegt für Mito nur bei 0,5 mg/ml. Um eine höher konzentrierte Stammlösung herzustellen, müsste der pH-Wert des Lösungsmittels niedriger sein. Bei pH 4 ist die Löslichkeit von Mito auf 6,7 mg/ml erhöht [75]. Ein saurer pH-Wert ($\text{pH} < 6$) beschleunigt allerdings den Abbau von Mito und würde somit die Haltbarkeit und Stabilität bei der Lagerung negativ beeinflussen [76].

Da die Lagerstabilität von Medikamenten sowohl für experimentelle Untersuchungen als auch für den späteren klinischen Einsatz von großer Bedeutung ist, wurde von Einschlussversuchen im sauren Milieu abgesehen.

6.3 Liposomenstabilität

6.3.1 TSL(Mito)

Die temperaturabhängige Freisetzung der Liposomen *in vitro* zeigte, dass die Liposomen in HN-Puffer pH 7,4 bzw. FCS innerhalb von 5 min bei Temperaturen um die Körpertemperatur (37 °C) mit $33,4 \pm 12,9\%$ bzw. $37,6 \pm 11,6\%$ eine erhebliche Menge an Mito freisetzten (siehe Abbildung 8). TSL(Gem) zeigten im Vergleich dazu innerhalb der gleichen Zeitspanne bei Temperaturen $\leq 40\text{ °C}$, sowohl in HN-Puffer pH 7,4 als auch in FCS, eine Gem-Freisetzung von weniger als 6% [37]. Somit ist die TSL(Mito)-Formulierung als instabil einzustufen. Bei Temperaturen zwischen 41 °C und 42 °C war die Freisetzung sowohl in Puffer als auch in FCS am höchsten. Unabhängig vom Milieu zeigte sich bei Temperaturen über T_m ($> 42\text{ °C}$) ein Rückgang in der Freisetzungsrates (siehe Abbildung 8). Die Freisetzungsrates während des Übergangs der Membranphasen ist durch das Auftreten von Lipidgrenzflächen in beiden Phasen am höchsten [6]. Überschreitet man diese Temperatur, ist die Freisetzung des Wirkstoffes erneut geringfügig

erschwert. Auch in der flüssig-kristallinen Phase wird, im Vergleich zur soliden Gelphase, Wirkstoff frei. Dies geschieht aufgrund der höheren Unordnung und der geringeren Packungsdichte der Lipide in der Membran. Somit wurde innerhalb von 5 min weniger Wirkstoff frei als bei der Erwärmung entsprechend der T_m (siehe Abbildung 8). Würde das Zeitintervall der Erwärmung verlängert werden, würde auch bei höheren Temperaturen der gesamte Wirkstoff aus den Liposomen freigesetzt werden. Bei aktiv eingeschlossenen Substanzen wie Dox wird der Wirkstoff über einen pH-Gradienten im Liposom eingeschlossen und durch Protonierung dort festgehalten (Protonenfalle) (vgl. 4.1.2). Bei Temperaturerhöhung kollabiert dieser pH-Gradient durch den Austausch zwischen Intra- und Extravesikulärraum während der Phasenumwandlung. Der fehlende pH-Gradient hat zur Folge, dass Dox, unabhängig von der Phase der Membran, ungehindert über diese diffundieren kann [77]. Somit ist der Effekt des Rückgangs der Freisetzung aufgrund der Membranstabilisierung zwar vorhanden, allerdings ist das Zeitfenster für die Beobachtung des Phänomens viel kürzer, da der Wirkstoff aufgrund des fehlenden pH-Gradienten auch durch Diffusion zügig aus den Liposomen entweichen kann.

Auch bei der Datenerhebung *in vivo* waren die Ergebnisse sowohl mit freiem als auch mit liposomalem Mito nur wenig zufriedenstellend. In der Pharmakokinetikstudie lagen die Ergebnisse für nicht liposomales Mito schon nach 2 min unter der Nachweisgrenze. In einer Pharmakokinetikstudie, in der Mito als Prodrug in Liposomen eingebaut wurde, wurde auch die Plasmakonzentration mit nicht liposomalem Mito getestet [78]. Bei i.v. Injektion von 1 mg/kg in Sprague–Dawley Ratten konnte eine maximale Anfangskonzentration von 8,4 µg/ml, bei einer Halbwertszeit von 2 min, ermittelt werden. 30 min nach der Injektion konnte trotz 10-fach erhöhter Injektionsdosis kein Mito mehr nachgewiesen werden. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Mito und der Injektion von nur 0,1 mg/kg war die Plasmakonzentration nach 2 min bereits unter die Nachweisgrenze gesunken. Aus diesem Grund konnte der Wirkstoff im Plasma nicht mehr detektiert werden. Trotz der erschwerten Messbedingungen, aufgrund der niedrigen Dosis von 0,1 mg/kg Körpergewicht, konnten nach 2 und 10 min

Werte für das liposomale Mito im Plasma erhoben werden. Diese fielen mit $0,78 \pm 0,38 \mu\text{g/ml}$ und $0,34 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$ sehr niedrig aus (vgl. Tabelle 17). Die Plasmakonzentration 2 min nach Injektion enthielt nur 3% der zu erwartenden Anfangskonzentration. Auch langzirkulierende Liposomen zeigten sich nach passivem Einschluss von Mito äußerst instabil (Plasma-halbwertszeit $t_{(1/2)} < 1 \text{ h}$) [78].

Die hohe Instabilität dieser TSL(Mito) lässt vermuten, dass eine Stabilisierung nur über eine Veränderung der Formulierung zu erreichen wäre. Die Erhöhung der Phasenumwandlungstemperatur durch Steigerung des DSPC-Anteils oder der Einbau von Cholesterol, oder Polyethylenglykol (PEGylierung) in die Membran der Liposomen könnten dazu beitragen, eine stabilere TSL(Mito) Formulierung herzustellen [6]. Aufgrund der Instabilität *in vitro* und *in vivo*, wurde von weiteren Experimenten mit dieser TSL(Mito) Formulierung abgesehen.

6.3.2 TSL(Dox)

Bei der erstmaligen Injektion von TSL(Dox) in F344 Ratten wurden bei einer Dosis von 5 mg/kg bzw. 2 mg/kg 2 min nach der Injektion Plasmakonzentrationen von $142,3 \pm 25,57 \mu\text{g/ml}$ bzw. $39,2 \pm 7,38 \mu\text{g/ml}$ Dox erreicht (vgl. Tabelle 18). Das entspricht 114% bzw. 79% der c_{max} (Tabelle 20). Obwohl die Dosis von 5 mg/kg nur um das 2,5-fache erhöht ist, ist die Konzentration nach 2 min um das 3,6-fache höher. Die $\text{AUC}_{0-120 \text{ min}}$ ist für die höhere Dosis sogar um das 4,3-fache größer (Tabelle 18). 90 min nach der Injektion sind 80% bzw. 40% der c_{max} und 71% bzw. 51% des 2 min Wertes von Dox im Plasma feststellbar (vgl. Tabelle 20). Vergleicht man die Plasmahalbwertszeiten ($t_{1/2}$) bei Injektion von 2 mg/kg TSL(Dox) mit der bei Verabreichung von 5 mg/kg, ist die Zirkulationszeit der TSL(Dox) von 96,8 min auf 165,6 min verlängert (vgl. Tabelle 18, Tabelle 20). Für langzirkulierende Liposomen wurde dieser dosisabhängig verringerte Abbau in BALB/c Mäusen, bei Verabreichung von 2,5–20 mg/kg Caelyx[®], beschrieben [79]. Bei 8-facher Dosiserhöhung von Caelyx[®] wurden 40 h nach der Injektion 15-fach höhere Dox-Konzentrationen im Plasma gemessen. Im

Lebergewebe reicherte sich bei der höheren Dosis nur dreimal mehr Dox an, wohingegen die Konzentration im Tumor 12-fach höher war. Dafür verantwortlich gemacht wurde eine Sättigung des Retikuloendothelialen Systems.

Auch für TSL(Dox) konnte eine dosisabhängige Verlängerung der Zirkulationszeit festgestellt werden. Vermutlich kann dieser Effekt auch durch die Sättigung des Retikuloendothelialen Systems erklärt werden. Für die Therapie würde das bedeuten, dass mit höheren Dosen eine effizientere Antitumorbehandlung erzielt werden könnte.

In der Krebstherapie folgen systemische Chemotherapien einem Protokoll mit zeitlich festgelegter Therapieabfolge. Bei verschiedenen Liposomenformulierungen verkürzt sich jedoch nach wiederholter Applikation die Plasmahalbwertszeit ($t_{1/2}$), aufgrund eines schnelleren Liposomenabbaus durch das Immunsystem [80], [81]. Dieser Effekt wird als beschleunigter Abbau im Blut (Accelerated Blood Clearance, ABC-Phänomen) bezeichnet [82]. Ein Pharmakokinetikexperiment mit wiederholter Applikation nach 7 und 14 Tagen mit TSL(Dox) sollte zeigen, ob die verwendete Formulierung auch von diesem Phänomen betroffen ist. Nach einer wiederholten Applikation von 2 mg/kg TSL(Dox) 7 bzw. 14 Tage nach der ersten Injektion ergab die 2 min Messung $31,8 \pm 3,92 \mu\text{g/ml}$ bzw. $40,8 \pm 0,73 \mu\text{g/ml}$ Dox im Plasma (vgl. Tabelle 18). Das entspricht 64% bzw. 82 % der c_{max} und 81% bzw. 104% der gemessenen Konzentration am Tag 0 (vgl. Tabelle 20). Nach 90 min war der Wert auf 36% bzw. 46% der errechneten c_{max} gesunken (vgl. Tabelle 20). Obwohl der Wert der Anfangskonzentration bei der wiederholten Verabreichung nach 7 Tagen niedriger war, blieben die Plasmahalbwertszeiten ($t_{1/2}$) mit 102,1 min bzw. 102,4 min identisch und entsprechen der Plasmahalbwertszeit ($t_{1/2}$) am Tag 0 (96,8 min) (vgl. Tabelle 18, Tabelle 20).

Für PEGylierte Liposomen basierend auf Ei-Lecithin und DSPE-PEG₂₀₀₀ wurde gezeigt, dass diese nach wiederholter Applikation zwischen 5 und 21 Tagen im Rattenblut einem beschleunigten Abbau unterlagen [83]. Nach

einer Erstinjektion derselben PEGylierten Liposomenformulierung in Ratten, wurden 4 h später Plasmakonzentrationen von 76,4% der injizierten Dosis ermittelt [80]. Injizierte man 7 Tage später PEGylierte Liposomen bzw. nicht PEGylierte DPPC Liposomen, wurden 4 h nach der zweiten Injektion 0,57% bzw. 13,2% der injizierten Dosis im Plasma gemessen. Für PEGylierten Liposomen wurden also signifikant niedrigere Plasmakonzentrationen gemessen als bei Ratten, die bei wiederholter Applikation nicht-PEGylierte Liposomen verabreicht bekamen. Trotzdem war die Plasmakonzentration bei Tieren, denen als zweite Injektion nicht-PEGylierte Liposomen injiziert wurden, deutlich geringer als bei der initialen Verabreichung nicht-PEGylierte Liposomen (62,8% der initialen Dosis nach 4 h). Daraus kann geschlossen werden, dass das ABC-Phänomen nicht ausschließlich bei PEGylierten Liposomen vorkommt. Außerdem konnte an Ratten durch Depletion der Makrophagen festgestellt werden, dass diese für den beschleunigten Abbau der Liposomen verantwortlich waren [80].

Weitere Rattenexperimente zeigten, dass bei zweimaliger i.v. Applikation von Caelyx[®] innerhalb von sieben Tagen kein beschleunigter Abbau der Liposomen stattfand, während dies bei einer Injektion von leeren PEGylierten Liposomen der Fall ist [80]. Es wird vermutet, dass Dox einen toxischen Effekt auf die Makrophagen ausübt und somit das Auftreten des ABC-Phänomens unterbindet [82]. In Mäusen wurden bei mehrmaliger Injektion innerhalb von vier Tagen mit 4 mg/kg Caelyx[®] sogar eine erhöhte Dox-Plasmakonzentration festgestellt [79]. Als Grund für den verringerten Abbau wurde eine Sättigung des Retikuloendothelialen Systems angegeben. Weitere Ergebnisse zeigten, dass bei einer Phospholipiddosis PEGylierter Liposomen $\geq 5 \mu\text{mol/kg}$ als Erstinjektion, eine anschließende zweite Injektion kein ABC-Phänomen auslöste. Vermutet wird, dass höhere Dosen eine Immuntoleranz hervorrufen [82]. In einer weiteren Studie, mit TSL bestehenden aus Phosphatidylcholin, DPPC, DPPG und Cholesterol und eingeschlossenem Dox wurde in einem Experiment mit WAG/RijH Ratten ebenfalls, statt eines beschleunigten Abbaus, eine Erhöhung der Dox Konzentration festgestellt, wenn die Injektion nach sieben Tagen wiederholt wurde [38]. Außerdem wurde bei der zweiten Injektion weniger Dox im

Lebergewebe gefunden, als bei der ersten Behandlung. Dies wurde damit begründet, dass bei der ersten Behandlung die Generation von Makrophagen, zu denen die Kupfferzellen in der Leber gehören, durch das zytotoxische Dox verringert wurde. Eine Makrophagengeneration lebt ca. sieben Tage. Es wird vermutet, dass das Retikuloendotheliale System zum Zeitpunkt der wiederholten Applikation noch nicht ausreichend erholt war. Die reduzierte Makrophagenzahl könnte ein Grund für den verringerten Liposomenabbau sein [38].

Die hier beschriebenen TSL(Dox) wiesen keine Änderung in der Zirkulationszeit auf, unabhängig vom Zeitpunkt der Applikation. Deshalb ist davon auszugehen, dass DPPG₂-TSL nicht vom ABC-Phänomen oder ähnlichen Vorgängen betroffen sind. Das Behandlungsintervall kann bei wiederholter Verabreichung also flexibel gewählt werden (vgl. Tabelle 18, Tabelle 20).

	Dosis [mg/kg]	c _{max} µg/ml	c ₂ % c _{max}	10 min % c _{max}	90 min % c _{max}	t _{1/2} [min]
Tag 0	5	125	114	90	80	165,6
Tag 0	2	50	79	73	40	96,8
Tag 7	2	50	64	69	36	102,1
Tag 14	2	50	82	83	46	102,4

Tabelle 20 - Pharmakokinetik TSL(Dox); Plasmakonzentrationen nach i.v. Injektion von 5 mg/kg bzw. 2 mg/kg c₂ = 2 min nach Injektion, t_{1/2} = Plasmahalbwertszeit (t_{1/2}), c₀ = theoretisch mögliche Plasmakonzentration

6.3.3 TSL(Gem)

Bei i.v. Verabreichung von 6 mg/kg TSL(Gem) in F344 Ratten würde die c_{max} im Plasma 150 µg/ml betragen. Nach 2 min, 10 min und 90 min nach der Injektion wurden 119%, 110% und 76,4% der c_{max} nachgewiesen (vgl. Tabelle 19). Die Plasmahalbwertszeit (t_{1/2}) betrug für diese Formulierung 149,4 min, während publizierte Daten eine Plasmahalbwertszeit (t_{1/2α}) für

nicht liposomales Gem von 4,2 min, bei gleicher Dosis in BN Ratten, ergaben [37].

Auffällig ist der Unterschied in den F344 Ratten im Vergleich mit den BN Ratten [37]. 2 min nach der Injektion wurde in der F344 Ratte eine Plasmakonzentration von 119% der c_{\max} gemessen, während in den BN Ratten nur 90% der c_{\max} nachgewiesen wurden. Die für die F344 Ratten verwendeten Liposomenchargen wiesen allerdings eine durchschnittliche Vesikelgröße von 161 nm auf und waren daher größer als die in der Publikation beschriebenen 129 nm großen TSL(Gem) [37]. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ist bekannt, dass die Liposomengröße Einfluss auf die Liposomenstabilität hat [37], [77]. Je kleiner die Liposomen sind, desto stärker ist die Krümmung der Liposomenmembran. Dadurch entstehende Defekte in der Lipiddoppelschicht, können eine vorzeitige Wirkstofffreisetzung zur Folge haben [77]. Dies könnte ein Grund für Konzentrationsunterschiede in den Pharmakokinetikstudien sein. Allerdings müsste auch die Plasmahalbwertszeit($t_{1/2}$) im Vergleich zu den größeren Liposomen kürzer sein. Diese ist mit 155,4 min aber nahezu identisch [37]. Bei starker Verdünnung, wie bei einer Bolusinjektion, kann es zu einer initialen Wirkstofffreisetzung kommen. Aufgrund der höheren Oberflächenspannung und der dadurch entstehenden Packungsdefekte kleinerer Vesikel sind diese beim Auftreten solcher Effekte stärker betroffen [77]. Dies könnte die niedrigere Plasmakonzentration nach 2 min bei vergleichbarer Halbwertszeit erklären (vgl. Tabelle 19). Ein Grund könnte auch der Unterschied der Applikationsmethode sein. In der beschriebenen Studie, wurden den weiblichen F344 Ratten die TSL(Gem) über einen Venenverweilkatheter in der *V. coccygea lateralis* appliziert. Das Blut wurde auf der kontralateralen Seite des Schwanzes entnommen. Bei der publizierten Methode wurde in die *V. penis* männlichen BN Ratten injiziert. Eine andere Umverteilung der Liposomen im Körper, aufgrund der größeren Distanz zwischen der Stelle für die i.v. Applikation und die Blutentnahme, könnte ebenso Ursache für den niedrigeren Plasmaspiegel gewesen sein. Da die Plasmahalbwertszeiten vergleichbar sind, ändert sich nichts bezüglich der Aussage über die Liposomenstabilität.

Vergleicht man die TSL(Gem) mit einer auf DPPC und Surfactant Brij78 basierenden Formulierung von TSL (HaT-Gem), deren Zirkulationszeit mit einer Dosis von 20 mg/kg in C57BL/6 Mäusen getestet wurde, so sind die Werte nach 60 min mit 85% für TSL(Gem) und 82% für HaT-Gem der c_{\max} nahezu identisch [13]. Die in dieser Arbeit verwendeten TSL(Gem) zeigten sich 2 h nach Injektion mit 69% der c_{\max} stabiler, als die HaT-Gem mit nur 40% der c_{\max} . Die geringere Plasmakonzentration nach 2 h zeigt eindeutig, dass die HaT-Gem Formulierung weniger stabil ist, als die in dieser Arbeit untersuchten TSL(Gem). Aufgrund der Beobachtungen der dosisabhängigen verlängerten Plasmahalbwertszeiten($t_{1/2}$) mit TSL(Dox), wäre zu erwarten gewesen, dass die Zirkulationszeit für HaT-Gem länger ist als für TSL(Gem) (vgl. Tabelle 18, Tabelle 20). Allerdings ist das Experiment bezüglich der Speziesunterschiede nicht direkt vergleichbar. Für TSL(Dox) konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Freisetzungsrates durch speziesabhängige Serumkomponenten beeinflusst wird. Nach einstündiger Inkubation von TSL(Dox) wurde in Rattenplasma nur 74% der Dox-Menge frei, die im Mausplasma freigesetzt wurde [84].

6.4 Anreicherung und Gewebeverteilung von TSL(Dox) im neuartigen Blasenkarzinom-Modell

6.4.1 Etablierung Tiermodell

Beim Hochrisiko-superfiziellen Blasenkarzinom kommt es nach TUR in 90% der Fälle zum Auftreten von Tumorrezidiven mit höherem Grad. Trotz intravesikaler Chemo- oder Immuntherapie ist eine radikale Zystektomie häufig die letzte Therapiechance [45]. Neue Therapiestrategien zur effektiveren Behandlung des Blasenkarzinoms werden daher dringend benötigt. Die wärmeinduzierte, zielgerichtete, systemische Chemotherapie mit TSL könnte die Effizienz der Therapie maßgeblich verbessern. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein *in-vivo*-Tumormodell in der Ratte

entwickelt, um TSL bei der Behandlung des Blasenkarzinoms zu untersuchen.

Im Wachstum- und Progressionsverhalten *in vivo* kommt die Blasenkarzinomzelllinie AY27 der Ratte dem menschlichen Urothelkarzinom nahe. Durch einstündige Tumorzellinstillation, nach erfolgter chemischer Vorbehandlung der Blase, kann das Tumorstadium induziert werden. Die Vorbehandlung mit Säure bzw. Lauge erzeugt einen Schleimhautdefekt, der den Zellen das Anwachsen ermöglicht. Es wurde gezeigt, dass ohne chemische Behandlung der Blaseschleimhaut, mit Instillation von $1,5 \times 10^6$ AY27 Zellen, kein Tumorstadium generiert werden kann [63]. Erst eine Blaseninstillation von 0,4 ml 0,1 N HCl und anschließender Neutralisation mit 0,4 ml 0,1 N KOH (jeweils 15 s.) führte in 95% der Tiere zum Wachstum eines Tumors [63]. Das Tumorstadium wurde zwischen Tag 13 und Tag 50 nach der Tumorzellinstillation evaluiert. An Tag 13 bzw. 16 oder 17 nach Generierung des Tumors wurden 100% bzw. 65% der Tumoren als superfizielle Blasenkarzinome identifiziert. Das spricht für ein moderates Fortschreiten des Tumorstadiums. Die generalisierte chemische Vorbehandlung führte in den Experimenten dieser Arbeit zu einem übermäßigen Tumorstadium bereits nach fünf Tagen. Da anders als bei Xiao et al beschrieben, eine höhere Zellzahl verwendet wurde (4×10^6 Zellen), wird angenommen, dass dies der Grund für das schnelle Tumorstadium war. Es wurden maßgebliche Unterschiede im Progressionsverhalten des Blasenkarzinoms beschrieben. In Versuchen mit gleichartiger Generierung der Tumoren wurde an Tag 6 bzw. 10 nach Tumorzellinstillation bereits 25% bzw. 50% als Tumoren mit muskelinvasivem Wachstum identifiziert [57]. Dafür wurde eine gesteigerte Aggressivität der Zellen in höheren Kulturpassagen verantwortlich gemacht. Erhöhte Aggressivität der AY27 Zellen könnten ein weiterer Grund, für das übermäßige schnelle Tumorstadium nach der generalisierten Blasenconditionierung sein.

Tatsächlich konnte auch im Rahmen dieser Arbeit eine Veränderung der Zellen bei der Generierung von Tumoren *in vivo* festgestellt werden.

Allerdings äußerte sich das im Verlust der tumorigenen Eigenschaften der Zellen in höheren Passagen. Dieser Tumorigenitätsverlust in höheren Passagen der Kultur war für die Zelllinie AY27 bereits seit längerem an der Universität von Toledo bekannt (persönliche Mitteilung Rick Keck, Universität von Toledo, Ohio).

Nach den Erfahrungen mit der generalisierten chemischen Vorbehandlung sollten in Säure oder Lauge getränkte Mikro-Tupfer, einen lokalen Urotheldefekt erzeugen und so das Tumorwachstum in der Blase einschränken [56]. Der punktuelle Defekt führte zu lokalem Tumorwachstum, welches nach 5 Tagen eindeutig zystoskopisch erkennbar war. Dies stimmte mit Ergebnissen überein, die beschrieben, dass das Tumorwachstum bei > 90% der Tieren an Tag 5 zystoskopisch identifiziert werden konnte [57]. In dieser Studie wurde Tag 5 nach Zellinstillation als optimalen Behandlungszeitpunkt für eine intravesikale Therapie vorgeschlagen [57]. Für die Experimente dieser Arbeit wurde Tag 7 für die Behandlung gewählt, um sicherzustellen, dass ausreichend Tumormasse für die Gewebeanreicherungs-Studie vorhanden ist (siehe Abbildung 17).

Für die zielgerichtete Wirkstofffreisetzung aus TSL ist eine konstante Erwärmung des Zielgewebes unerlässlich. Bei der Etablierung neuer Tiermodelle ist oft der zu überwindende Größenunterschied zwischen Mensch und Versuchstier eine Herausforderung. Außerdem sollte das Ziel sein, den Aufbau möglichst einfach zu gestalten. Um tiefliegendes Gewebe zu erwärmen, wurde bereits ein spezieller Radiofrequenzapplikator für den Einsatz zur HT der Mäuseblase entwickelt [85]. Da der finanzielle Aufwand für die Anschaffung eines derartigen Gerätes sehr groß ist, wurde nach anderen Methoden gesucht. Für die Erwärmung mit einer Lichtquelle ist die Harnblase aufgrund ihrer anatomischen Lage nicht erreichbar. Um die anatomischen Gegebenheiten des von außen zugänglichen, im Körperinneren liegend Hohlorgans auszunutzen, wurde ein Modell aufgebaut, das es ermöglichte, über eine kontinuierliche Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung, die Blase zu erwärmen (siehe Abbildung 7, Abbildung 20). Dabei musste sichergestellt werden, dass über den Katheter

für den Abfluss genügend Wasser ablaufen konnte. Ansonsten hätte ein intravesikaler Überdruck zu einer Ruptur der Blase geführt. Mit der Peristaltikpumpe konnte 550 ml/h Flüssigkeit über den 24G Katheter ins Blasenlumen geleitet werden. Bei vollständig gefüllter Blase lief dies über den 18G Katheter ab (siehe Abbildung 7, Abbildung 20). Aufgrund der guten Wärmeverteilung von Flüssigkeiten und dem kleinen Volumen der Rattenblase, war davon auszugehen, dass die Temperatur der Blasenwand mit der Temperatur der abfließenden Flüssigkeit übereinstimmt und konnte somit dort gemessen und kontrolliert werden. Aufgrund von Temperaturverlusten während des langsamen Transports der physiologischen Kochsalzlösung über das lange, nicht isolierte Schlauchsystem in die Blase, musste die Wasserbadtemperatur auf $> 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ gehalten werden. Eine ständige Temperaturkontrolle war unerlässlich, da schon geringe Schwankungen der Raumtemperatur zu einem Absinken der intravesikalen Temperatur führten. Aus hygienischen Gründen handelte es sich um keinen zirkulierenden Wasserkreislauf. Daher musste ein Leerlaufen des Wasserbades verhindert werden. Um auch dabei Temperaturschwankungen vorzubeugen wurde über eine Infusionsflasche tropfenweise und kontinuierlich, frische physiologische Kochsalzlösung in das Wasserbad geleitet. Die Körpertemperatur wurde während des gesamten Experimentes mit einer Rektalsonde überwacht und konstant gehalten (siehe Abbildung 21). Wärmeverluste wurden mit einer Wärmematte ($38\text{ }^{\circ}\text{C}$) vermieden. Ebenso bedeutend war es, dass die Körpertemperatur $38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ nicht überschritt. Erhöhte Körpertemperatur hätte zur unkontrollierten, systemischen Wirkstofffreisetzung aus den TSL geführt. Aufgrund der anatomisch nahen Lage von Rektum und Blase ist anzunehmen, dass die gemessenen Werte geringfügig höher waren, als die eigentliche Körpertemperatur (Körpertemperatur Ratte $37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Publierte Daten zeigten, dass bei einstündiger Radiofrequenz HT der Rattenblase auf $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ auch die rektal gemessene Temperatur auf $> 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ steigt, während oesophagial gemessene Temperaturen von maximal $39,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ gemessen wurden [86]. Das heißt, rektale Temperatur und gemessene Temperatur variieren um $2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bei intravesikaler Temperatur von $41\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden in diesem Experiment rektal $39,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ gemessen [86]. Man muss davon

ausgehen, dass mit dem Radiofrequenzadapter der Bereich der HT nicht so gezielt abgegrenzt werden konnte, wie es bei der Wärmebehandlung mit Blasenspülung durch die Blasenwand selbst erfolgte. Außerdem war es aufgrund einer moderaten Erwärmung auf nur 41 °C in den hier beschriebenen Experimenten nötig, die Tiere auf einer Matte mit 38°C zu wärmen. Dies war im Versuch von Haveman et al. (2003) nicht der Fall. Deshalb ist davon auszugehen, dass der Unterschied zwischen rektal gemessener Temperatur und der eigentlich gemessenen Körpertemperatur geringer war. Mit der beschriebenen Erwärmungsmethode war es möglich, bei konstant bleibender Körpertemperatur, die Blase über einen Zeitraum von 1h, auf 41 °C zu erwärmen (siehe Abbildung 21). Eine gesundheitliche Beeinträchtigung oder eine Schädigung durch die einstündige Erwärmung der Blase konnte im anschließenden Beobachtungszeitraum von 14 Tagen, bei keinem Tier beobachtet werden. Schädigungen der Blase durch HT sind erst ab Temperaturen von 43 °C beschrieben [86].

6.4.2 Anreicherung und Gewebeverteilung von TSL(Dox)

Die Nachweisbarkeit von Dox in Geweben mittels HPLC wurde ausgenutzt, um die Anreicherung im Zielgewebe und die Verteilung in den Organen bei verschiedenen Behandlungsmethoden, im etablierten Tumor-Modell zu untersuchen.

Anreicherung Dox in Milz und Leber

Nach der systemischen Applikation von 5 mg/kg TSL(Dox) +HT wurde in Milz bzw. Leber 1,4 x mehr Dox nachgewiesen, als bei der Behandlung mit nicht liposomalen Dox +HT bei gleicher Dosierung (siehe Abbildung 22, Abbildung 23, vgl. Tabelle 21). Liposomale Formulierungen werden von Makrophagen abgebaut und der eingeschlossene Wirkstoff akkumuliert daher verstärkt in den Immunorganen Milz und Leber [87], [80]. Nach intravesikaler Therapie mit 5 mg/kg Dox waren die Konzentrationen in Milz bzw. Leber um das 5,6-fache bzw. 4,0-fache niedriger. Auffälligkeiten sieht man bei der Behandlung mit der niedrigeren intravesikalen Dosis von 0,5 mg/Tier. Diese entspricht der Hälfte der 5 mg/kg Dosis unter der Annahme, dass alle Ratten

ein Körpergewicht von 200 g haben. Bei halber Dosierung sind die Werte in der Milz bzw. Leber um das 6,6-fache bzw. 5,5-fache niedriger, als bei der Dosis von 5 mg/kg (siehe Abbildung 22, Abbildung 23). Das bedeutet, dass bei einer Dosis von 5 mg/kg ein Vielfaches mehr des intravesikalen Wirkstoffes in die Blutbahn übertritt, als bei der Verwendung der halben Dosis. Aufgrund der makroskopischen Beurteilung der Blase muss davon ausgegangen werden, dass eine intravesikale Dosis von 5 mg/kg Dox zu hoch ist, da sie das Gewebe stark schädigt (siehe Abbildung 29). Es wird daher vermutet, dass die zu hohe intravesikale Dox-Last einen vermehrten Übertritt des Wirkstoffs in die Blutbahn gewährt und zu einer entsprechenden Akkumulation in der Milz führt.

Anreicherung Dox im Herz

Kardiotoxizität limitiert beim Menschen den Einsatz von Dox. Die Wirkstoffkonzentration von nicht-liposomalem Dox war mit 12,64 ng/mg am höchsten (siehe Abbildung 25, vgl. Tabelle 21). Verglichen damit, reicherte sich bei der Behandlung mit TSL(Dox) +HT um 34% weniger Wirkstoff im Herzen an. Bei intravesikaler Behandlung mit 5 mg/kg Dox verringert sich die in der Herzmuskulatur gemessene Konzentration sogar um 80%.

Anreicherung Dox in der Niere

Die Niere zeigte für nicht liposomales Dox und TSL(Dox) eine vergleichbare Anreicherung (siehe Abbildung 24, vgl. Tabelle 21). Im Vergleich zu den Konzentrationen in Milz und Leber zeigten beide intravesikalen Dosisstufen auffallend hohe Gewebekonzentrationen in der Niere. Die gemessene Dox-Konzentration betrug 40% (5 mg/kg Dox) bzw. 60% (0,5 mg/kg Dox) der Konzentration, die bei systemischer Behandlung gefunden wurde (siehe Abbildung 24). Eine mögliche Erklärung für die vermehrte Anreicherung in der Niere bei intravesikaler Therapie, könnte ein Aufsteigen der Dox-Lösung über den Harnleiter in die Niere sein. Außerdem ist dies ein Hinweis, dass Dox bei intravesikaler Therapie nicht nur durch Penetration der Blasenwand in das Blutgefäßsystem übertritt, sondern auch durch Aufsteigen in die Nieren, in den Körperkreislauf gelangt.

Dosis 5 mg/kg	Milz [ng/mg]	Leber [ng/mg]	Niere [ng/mg]	Herz [ng/mg]
Dox i.v. +HT	42,06	17,40	26,80	12,64
TSL(Dox) +HT	58,96	24,29	26,45	8,40
Dox intravesikal -HT	10,44	6,07	10,7	2,53

Tabelle 21 – Dox-Konzentrationen in den Organen nach einstündiger systemischer Behandlung mit TSL(Dox) +HT bzw. Dox +HT oder intravesikaler Therapie –HT

Anreicherung Dox in den Blasenschichten

Vergleicht man die Gewebeanreicherung in den einzelnen Blasenschichten bei systemischer Behandlung mit 5 mg/kg Dox, wird deutlich, dass nur wenig nicht-liposomales Dox das Zielgewebe erreicht. Bei nicht liposomalem Dox +HT wurden im Urothel bzw. in der *Tunica muscularis* nur 8% bzw. 9% der Wirkstoffmenge nachgewiesen, die bei der Behandlung mit TSL(Dox) +HT erreicht wurden (siehe Abbildung 26). Der Anteil der gemessenen Wirkstoffkonzentration in der *Tunica muscularis* in Relation zu der im Urothel zeigte mit 50% bei nicht liposomalem Dox +HT und 45% bei TSL(Dox) +HT eine vergleichbare Dox-Verteilung (vgl. Tabelle 22).

Bei der intravesikalen Therapie mit 5 mg/kg Dox war die Konzentration in beiden Schichten höher (siehe Abbildung 26). Allerdings können diese Messungen nicht gewertet werden. Wie bereits erwähnt, wurden bei der makroskopischen Beurteilung der Blasenwand lokale bis generalisierte Toxizitäten festgestellt (Abbildung 29). Aufgrund der Annahme, dass die hohe lokale Menge an Dox die Blase stark schädigt, wurde die intravesikale Dosis auf 0,5 mg/Tier reduziert (~ 50% der 5 mg/kg Dosis). Bei dieser Dosis wurde festgestellt, dass das Vorhandensein von Tumorgewebe eine entscheidende Rolle für die Anreicherung spielt. So sinkt die Dox-Konzentration im Urothel bzw. in der *Tunica muscularis* bei vorhandenem Tumorgewebe auf 40% bzw. 52% der gemessenen Konzentration im Gewebe einer gesunden Blase (siehe Abbildung 27). Der Wirkstoff muss durch Diffusion das Gewebe penetrieren. Da bei einem vorhandenen Blasentumor die normalerweise ~ 500 µm dicke Blasenwand [88], aufgrund der superfiziellen Wucherung stark verdickt ist, kommt es zu einer

Verlängerung der Diffusionsstrecke. Somit nimmt die Wirkstoffkonzentration sowohl im Urothel, als auch in der darunter liegenden *Tunica muscularis* ab. Für Mito bzw. Dox konnte an Blasen von Hunden bzw. Menschen gezeigt werden, dass es bei intravesikaler Penetration von Wirkstoffen durch die Blasenwand zu Konzentrationsverlusten kommt [89], [90]. Über das Urothel hinweg kam es zu einem 30-fachen Konzentrationsverlust. Die Konzentration der Wirkstoffe nahm alle 500 µm Gewebe um 50% ab.

Das Verhältnis der Wirkstoffkonzentration in den Blasenschichten veränderte sich aufgrund des Tumorgewebes nicht. Bei Harnblasen ohne bzw. mit Tumor wurden bei intravesikaler Therapie 17% bzw. 22% der erreichten Konzentration des Urothels auch in der *Tunica muscularis* nachgewiesen (vgl. Tabelle 22). Die oberflächliche Tumorgewebemasse reduzierte sowohl die Dox-Konzentration im Urothel, als auch in der *Tunica muscularis*. Dabei blieb die Verteilung zwischen den Schichten gleich.

Bei der Behandlung mit 5 mg/kg TSL(Dox) +HT wurden beim Vorhandensein eines Tumors im Urothel 85% und in der *Tunica muscularis* 75% der Konzentrationen gemessen, die in der tumorfreien Blasenwand nachgewiesen wurden (siehe Abbildung 27). Der Anteil des Dox in der *Tunica muscularis*, im Vergleich zum Urothel, beträgt 46% ohne und 40% mit Tumor. Bei der Behandlung mit 0,5 mg/kg TSL(Dox) +HT wurden 38% der in der Schleimhaut gemessenen Konzentration in der Muskelschicht nachgewiesen.

Einen deutlichen Unterschied zwischen der intravesikalen Therapie und der systemischen Behandlung mit TSL(Dox) +HT erkennt man, wenn Tumorgewebe vorhanden ist. Bei der intravesikalen Therapie wurden im Urothel bzw. in der *Tunica muscularis* nur 78% bzw. 45% der Wirkstoffmenge nachgewiesen, die bei der zielgerichteten Behandlung erreicht wurden (siehe Abbildung 27, Tabelle 22).

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch systemische Behandlung mit TSL(Dox) +HT, vor allem in der *Tunica muscularis*, deutlich höhere Konzentrationen

erreicht werden können, als bei der intravesikalen Therapie. Die geringe Wirkstoffanreicherung in tieferen Blasenschichten wird für die hohe Rezidivrate nach intravesikaler Chemotherapie verantwortlich gemacht. Während oberflächliche Tumorzellen durch intravesikale Wirkstoffinstillation mehr Wirkstoff anreichern als das Normalgewebe, werden in tieferen Gewebeschichten keine therapeutischen Wirkstoffkonzentrationen erreicht, um dort befindliche Tumorzellen effektiv abzutöten [91]. Die Arbeit unter dem Mikroskop erforderten Erfahrung bei der Trennung der dünnen Blasenschichten. Dies ist mit hohen Standardabweichungen der Konzentrationsmessungen verbunden (siehe Abbildung 26, Abbildung 27). Trotzdem kann eine Tendenz erkannt werden, die auf einen möglichen Vorteil, der zielgerichteten systemischen Therapie beim Blasenkarzinom hinweist.

	Dosis	ohne Tumor		Verhältnis TM/SH [%]	mit Tumor		Verhältnis TM/SH [%]
		SH [ng/mg]	TM [ng/mg]		SH [ng/mg]	TM [ng/mg]	
TSL(Dox) +HT	5 mg/kg	119,20	54,30	46	102,18	40,51	40
	0,5 mg/Tier	-	-	-	47,50	17,9	38
Dox intravesikal	5 mg/kg	361,04	289,77	80	-	-	-
	0,5 mg/Tier	91,73	15,40	17	37,02	7,97	22

Tabelle 22 - Dox-Konzentrationen Blase ± Tumorgewebe, bei der Therapie TSL(Dox) +HT systemisch oder Dox intravesikal –HT, 5 mg/kg und 0,5 mg/Tier

Dox Plasmakonzentrationen

Die initiale c_{\max} bei systemischer Injektion von 5 mg/kg Dox beträgt 125 µg/ml. Während nach 1h Behandlung mit nicht liposomalem Dox +HT die Dox-Konzentrationen in Herz, Milz, Niere und Leber hoch waren, wurde im Gewebe der Blase nur wenig Dox nachgewiesen. Auch im Plasma wurde nach Abschluss der Behandlung nur noch 0,19% der c_{\max} gemessen (siehe Abbildung 30). Die niedrige Plasmakonzentration nach 1h Behandlung zeigte, dass die Umverteilung von Dox abgeschlossen war und die Konzentration im Zielgewebe auch bei längerer Therapie nicht weiter ansteigen hätte können (Abbildung 30).

Nach der Behandlung mit TSL(Dox) +HT der gesunden bzw. Tumorgewebe enthaltenden Blase ergaben die Plasmakonzentrationen, dass zum gleichen Zeitpunkt noch 32% bzw. 20% der c_{\max} im Plasma zirkulierten (siehe Abbildung 30). Bei der Behandlung der Tiere mit Blasentumor erklärt sich die um 12% niedrigere Dox-Plasmakonzentration durch die vergrößerte und gut durchblutete Gewebemasse aufgrund des Tumors, in der das Dox freigesetzt werden konnte. Aufgrund des geringen Blasengewebes, könnte eine Reduzierung der Dosis dazu führen, dass ein größerer Anteil der TSL(Dox) innerhalb der einstündigen Erwärmung ins Zielgewebe übertritt. Das hätte eine niedrigere Plasmakonzentration am Ende der Behandlung zur Folge. Wie die Ergebnisse zeigten, führte eine niedrigere Dosis auch zu einer geringere Wirkstoffanreicherung im Zielgewebe (siehe Abbildung 28, Abbildung 27). Ein Grund dafür könnte die verkürzte Plasmahalbwertszeit ($t_{1/2}$) sein, die für TSL(Dox) unter 6.3.2 bei niedrigerer Dosis diskutiert wurde (Tabelle 18, Tabelle 20). Auch durch eine Verlängerung der Erwärmung könnte mehr Wirkstoff im Gewebe angereichert werden. Bei einer Ratte mit 500 g beträgt die Plasmaflussrate durch die Rattenblase 60 ml/h [92]. Wenn 4% des Gewichts der Ratte Blut ist, bedeutet das theoretisch, dass das gesamte Blutvolumen in 1 h ca. 3 x die Blase passagiert [62]. Bei Erwärmung der Blase ist die Durchblutung erhöht und somit auch das Passagevolumen. Eine Verlängerung der Wärmebehandlung würde aufgrund weiterer Blutpassagen durch die Blase, weiterhin lokal Wirkstoff aus den noch zirkulierenden Liposomen lokal freisetzen. Würden die Proben nicht direkt nach der einstündigen HT-Behandlung entnommen werden, sondern zu einem späteren Zeitpunkt, könnte durch die lange Zirkulationszeit der TSL(Dox), passiv noch mehr Wirkstoff im Tumorgewebe angereichert werden. Aufgrund der Fenestrierung der Epithelzellen von Tumorgefäßen kommt es gerade dort, durch den EPR-Effekt, vermehrt zum Übertritt von Liposomen in das Gewebe [4], [93], [94]. In einer Therapiestudie könnte man im Anschluss an die zielgerichtete Therapie, aufgrund der noch vorhandenen zirkulierenden TSL(Dox), von diesem Effekt profitieren. Bei langzirkulierenden nicht-thermosensitiven Liposomen nutzt man die Kombination aus verlängerter Plasmahalbwertszeit und passiver Anreicherung, um den Wirkstoff im Tumorgewebe zu akkumulieren [95]. Im

Gegensatz zu den auf Cholesterol basierenden Liposomen, würde bei der TSL(Dox) Formulierung durch die geringere Stabilität bioverfügbares Dox passiv im Gewebe akkumulieren können [10], [16].

6.5 Therapie mit TSL(Gem) am s.c. Weichteilsarkom-Modell

In einer Therapiestudie konnte im s.c. Weichteilsarkom-Modell BN175 bereits der Vorteil von TSL(Dox) gegenüber nicht liposomalem Dox gezeigt werden [16]. In der vorliegenden Arbeit sollte die neuartige Formulierung TSL(Gem), und ihre Eignung für die Therapie in aufwendigeren Tumormodellen, wie dem neu etablierten Blasenkarzinom-Modell, unter Beweis gestellt werden.

In der Studie zeigte sich bei der Therapie mit TSL(Gem) in Kombination mit lokaler Lampen-HT eine signifikant gesteigerte Verzögerung im Tumorwachstum gegenüber allen anderen Gruppen (siehe Abbildung 16). Während die mit physiologischer Kochsalzlösung +HT behandelte Kontrollgruppe ein ungehindertes Tumorwachstum aufwies, konnte in allen mit Wirkstoffformulierungen therapierten Gruppen, eine mehr oder weniger starke inhibitorische Wirkung beobachtet werden (siehe Abbildung 16). Bei der Applikation von nicht liposomalem Gem i.v. ergab sich weder ein synergistischer Effekt aufgrund der Kombinationstherapie mit HT, noch kam es zu einer wärmebedingten Inhibition der therapeutischen Effizienz des Zytostatikums. Der Unterschied zwischen der Verabreichung von nicht-liposomalem Gem, alleine oder zusammen mit HT, war nicht signifikant. In einer Therapiestudie mit s.c. R-1 Rhabdomyosarkom der Ratte zeigte sich, dass der Zeitpunkt der Gewebeerwärmung für eine Effizienzsteigerung des Wirkstoffs entscheidend ist [96]. Bei den vier Versuchsgruppen, die eine i.v.-Injektion von 20 mg/kg Gem ohne, mit simultaner HT, mit HT 24 h oder 48 h nach Wirkstoffapplikation bekamen (HT 43 °C, 70 min), wurde bei allen eine Tumorwachstumsverzögerung festgestellt. Im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle, verzögerte die Therapie mit HT 48 h nach der Injektion, das Tumorwachstum um 8,6 Tage, während es bei den drei

anderen Behandlungsgruppen nur eine Verzögerung von 6 Tagen ergab. Als Ursache für diesen Effekt wurde eine wärmeinduzierte Inhibition der Aktivierung der zytotoxischen Gem-Metaboliten (Gemcitabinmonophosphat, Gemcitabindiphosphat, Gemcitabintriphosphat) in der Zelle genannt [96]. Es wird vermutet, dass 48 h nach der Behandlung die Metabolisierung abgeschlossen ist. Eine HT-Behandlung zu diesem Zeitpunkt konnte die zytotoxische Wirkung des aktivierten Zytostatikums potenzieren. Natürlich darf die Möglichkeit für eine weitere Steigerung der Effizienz durch eine zeitlich versetzte Chemo- und Wärmebehandlung nicht außer Acht gelassen werden. Wichtig für die Qualität der Ergebnisse in der hier bearbeiteten Studie war es sicher zu stellen, dass weder ein Vorteil, noch ein Nachteil durch die Erwärmung auf 41 °C entstand. Es wurde ausschließlich die gesteigerte Effizienz der zielgerichteten Therapie untersucht. Der Vollständigkeit halber sollte ergänzt werden, dass eine thermische Vorbehandlung des Gewebes und daraus resultierende Gefäßerweiterung, die Extravasation von Wirkstoffen erleichtern könnte. Damit könnte eine vermehrte Anreicherung von TSL(Gem) im Tumorgewebe erzielt werden. Mit einer zweiten HT-Behandlung würde der Wirkstoff lokal freigesetzt werden. Dadurch könnte die Therapieeffizienz gesteigert werden [97].

Eine erhöhte Wachstumsverzögerung gegenüber der Behandlung mit nicht-liposomalem Wirkstoff erreicht man durch die liposomale Verpackung. Bei einer Gem-Plasmahalbwertszeit ($t_{1/2\alpha}$) von 4,2 min [37], verringert der schnelle Abbau von nicht eingeschlossenem Wirkstoff, die Anreicherung im Tumorgewebe und schmälert so die therapeutische Effektivität, trotz wärmebedingter Mehrdurchblutung des Tumorgewebes [33]. Die Verlängerung der Zirkulationszeit durch den Einschluss in TSL erhöhte die Wirksamkeit des Gem im Vergleich zu nicht liposomalen Wirkstoff, auch ohne zielgerichtete Freisetzung signifikant ($p < 0,01$) (siehe Abbildung 16). Es wurde bereits in Mäusen beschrieben, dass durch den Einschluss von Gem in langzirkulierende Liposomen, die maximal tolerable Dosis von 360 mg/kg freiem Gem auf 6–9 mg/kg liposomalem Gem gesenkt wurde, und das bei gleichzeitiger Effizienzsteigerung der Therapie [98]. Auch das Auftreten der Hautreaktionen am Schwanz bei zwei von sechs Tieren deutet auf eine

Erhöhung der Toxizität durch liposomalen Einschluss hin (siehe Abbildung 16 Foto). Alle anderen Gruppen zeigten keine Toxizitäten. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass durch die zielgerichtete Freisetzung im Tumorgewebe der Wirkstoff dort angereichert wurde, während gesundes Gewebe verschont blieb. Die Tatsache, dass auch bei nicht liposomalem Gem keine Toxizität beobachtet wurde, hängt mit der kurzen Zirkulationszeit und dem schnellen Abbau zusammen. Die zielgerichtete Freisetzung durch TSL(Gem) +HT Lampe zeigte eine weitere Steigerung der Therapieeffizienz gegenüber der ausschließlichen Zirkulationszeitverlängerung (siehe Abbildung 16).

Gerade im Bereich des Pankreaskarzinoms könnte diese Art der Behandlung, aufgrund des schlechten Tumoransprechens bei systemischer Chemotherapie, Vorteile bringen. Für die Therapieresistenz dieser Tumorart wurde unter anderem die schlechte Vaskularisation des Gewebes, hypoxische Areale und das einer Barriere gleichende desmoplastische Stroma verantwortlich gemacht. Bei der Standardtherapie mit Gem erreicht nur wenig Wirkstoff die von extrazellulärer Matrix umgebenen Tumorzellareale [99]. HT induzierte die Wirkstofffreisetzung im Blutgefäßsystem des Zielgewebes. Dies führt zu höheren lokalen Wirkstoffkonzentrationen und somit zu erhöhter Eindringtiefe ins Gewebe [44]. Somit könnte mehr Wirkstoff die Tumoreale erreichen und das Therapieansprechen des Pankreaskarzinoms verbessert werden.

Da Gem als Prodrug fungiert und erst nach dem aktiven Transport in die Zelle über Phosphorylierung durch Deoxycytidinkinase in die aktiven Metaboliten überführt wird, kann es zu einer Sättigung der Metabolisierung, aufgrund von Erschöpfung des Deoxycytidinkinase-Pools, kommen [100]. In einer Phase-II-Studie wurden zwei Therapieregime mit Gem, und die Akkumulation von Gemcitabintriphosphat in mononukleären Zellen des peripheren Blutes verglichen. In einer Gruppe wurde eine 30-minütige Standard Infusionstherapie mit 2.200 mg/m² eingesetzt, während die andere Gruppe mit einer 150 minütigen „Fixed Dose Rate“ von 1.500 mg/m² behandelt wurde. In der Gruppe die über 30 min der höheren Dosis ausgesetzt war kam es, nach einem initialen linearen Anstieg der

Anreicherung, zur Ausbildung eines Plateaus. 90 min nach Beginn der Behandlung wurde eine gleichbleibende mediane Konzentration von 188 $\mu\text{mol/l}$ gemessen. Bei der Behandlung über 150 min mit geringerer Dosis, kam es zu einem linearen Anstieg der Gemcitabintriphosphat Anreicherung über den gesamten Behandlungszeitraum. Am Ende der Infusion lag die Gemcitabintriphosphatkonzentration bei 398 $\mu\text{mol/l}$ [101]. Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass bei einer einstündigen zielgerichteten Chemotherapie mit TSL(Gem) +HT und der damit verbundene hohen Wirkstoffbereitstellung über den gesamten Behandlungszeitraum, eine Sättigung der Wirkstoffmetabolisierung umgangen werden kann. Somit kann davon ausgegangen werden, dass mehr aktives Gemcitabintriphosphat im Tumor angereichert wird, als bei einer kurzfristigen Anflutung hoher Gem Dosen.

Der Einsatz von TSL(Gem) +HT im Wasserbad zeigte signifikant geringere Verzögerung im Tumorwachstum, als bei lokaler Therapie mit der Lampe (siehe Abbildung 16). Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass bei 42 °C die Freisetzungsrates in FCS innerhalb von 5 min für TSL(Gem) am höchsten war [37]. Bei der lokalen Erwärmung mit der Lampe durften allerdings Temperaturen von 41°C nicht überschritten werden. Das weiße Licht der Lampe enthält einen großen Anteil an blauem Licht, das nur eine geringe Eindringtiefe in das Gewebe besitzt [102]. Bei höheren Temperaturen würde die Oberfläche des Tumors so stark erwärmt, dass es zu toxischen Reaktion der Haut und des darunterliegenden Gewebes kommen würde (Erythem, Ödembildung, Hautnekrosen). Es wurde versucht mit Hilfe eines Einsteckfilters (Farbfilter rot) die Lichtanteile mit geringer Eindringtiefe herauszufiltern. Laut Transmissionskurve wurde damit Licht im Wellenlängenbereich < 600 nm herausgefiltert. Im Bereich von 350-400 nm wurden 20-50% des Lichts transmittiert. Ein werkseitig eingebauter Infrarotfilter, der eine Überhitzung des Lichtleiters verhindern soll, filtert Licht im Wellenlängenbereich von > 750 nm heraus (persönliche Mitteilung -4H-JENA engineering GmbH). Der Einsatz beider Filter führte dazu, dass die intratumorale Temperatur bei voller Lichtleistung < 40 °C blieb. Eine Freisetzung des Wirkstoffs war bei diesen niedrigen Temperaturen nicht zu

erwarten. Mit HT im Wasserbad kann das Gewebe gleichmäßig und ohne Problem auf 42 °C erwärmt werden, allerdings musste dafür die gesamte Gliedmaße in das Wasser getaucht werden. Dabei kommt es statt zu einer lokalen HT des Tumors, zu einer regionalen Erwärmung und einer damit verbundenen Wirkstofffreisetzung in der gesamten Hintergliedmaße [16]. Der unerwünschte Wirkstoffverlust in gesundem Gewebe, führte zu einem Absinken der Plasmakonzentration und hatte eine reduzierte Anreicherung von Gem im Tumor zur Folge. Somit war die therapeutische Effizienz verringert.

Trotzdem zeigte die Therapie mit TSL(Gem) +HT Lampe nur eine kurzzeitige Verzögerung im Tumorwachstum (siehe Abbildung 16). Gründe dafür könnten sehr rasches Tumorwachstum, die nur einmalige Behandlung mit einer geringen Dosis Gem, oder auch die unzureichende Freisetzung aufgrund zu niedriger Tumortemperatur sein. Um die T_m auf 41 °C zu reduzieren, könnte die Formulierung durch Senkung des DSPC Anteils optimiert werden. Mit hochfokussiertem Ultraschall oder Radiofrequenz-HT könnten allerdings auch problemlos intratumorale Temperaturen von 42 °C erreicht werden, ohne HT induzierte Gewebe-schäden zu verursachen. Auch eine mehrmalige Behandlung wäre, wie unter 6.3.2 beschrieben, mit diesen TSL problemlos möglich. In Kombination mit der Verabreichung der maximal tolerablen Dosis würde die Optimierung des Modells eine weitere Steigerung der Therapieeffizienz erwarten lassen.

7 Zusammenfassung

Zielgerichtete Chemotherapie solider Tumoren durch thermosensitive Liposomen in Kombination mit Doxorubicin, Gemcitabin und Mitomycin C

Auf DPPG₂ basierende thermosensitive Liposomen (TSL) mit Hyperthermie (HT) induzierter zielgerichteter Wirkstofffreisetzung sind eine vielversprechende Behandlungsstrategie in der Krebstherapie.

TSL können als Wirkstoffträgersysteme die Zirkulationszeit und Anreicherung von Wirkstoffen im Zielgewebe erhöhen. Die vielfältigen Krebserkrankungen zeigen unterschiedliches Tumorsprechen auf die routinemäßig eingesetzten Zytostatika. Daher wäre es vorteilhaft, verschiedene Wirkstoffe in TSL einschließen zu können, um Erstlinientherapien weiter zu verbessern. In dieser Arbeit wurden Mitomycin C (Mito) und Gemcitabin (Gem) erstmals in TSL eingeschlossen. Außerdem wurden sie *in vitro* und *in vivo* charakterisiert. Die bereits untersuchten TSL(Dox) sollten ihre Vorzüge in einem in dieser Arbeit neuentwickelten orthotopen Blasenkarzinom-Modell der Ratte demonstrieren. In Pharmakokinetikstudien wurde die Stabilität der TSL-Formulierungen getestet, die Dosisabhängigkeit untersucht und die Plasmahalbwertszeiten bei wiederholten Injektionen miteinander verglichen. Außerdem wurde eine neue Methode für die Tumorgenerierung und HT-Behandlung in der Rattenblase etabliert. Anschließend wurde die Gewebeverteilung und Tumoranreicherung in der Blase nach Behandlung mit TSL(Dox) +HT untersucht. Die Ergebnisse wurden mit denen der intravesikalen Therapie verglichen. Zusätzlich wurde die Therapieeffizienz von TSL(Gem) im subkutanen Weichteilsarkom untersucht.

Die Liposomen wurden durch die Lipidfilmhydratisierungs- und Extrusionsmethode hergestellt und aktiv oder passiv mit Wirkstoff beladen. Die TSL wurden mit Hilfe von dynamischer Lichtstreuung, Dünnschicht-

chromatographie, Phosphatbestimmung, Fluoreszenzspektroskopie und HPLC-Analyse charakterisiert. *In-vivo*-Experimente wurden unter Inhalationsnarkose in weiblichen F344 Ratten und männlichen Brown Norway Ratten, durchgeführt. Die HT-Behandlung wurde durch Erwärmung mit Licht oder Wasserbad im Weichteilsarkom-Modell oder einer Blasenspülung mit warmen Wasser im Blasenkarzinom-Modell durchgeführt.

TSL(Mito) wiesen eine niedrige Einschlusseffizienz auf und waren *in vitro* und *in vivo* sehr instabil. TSL(Gem) und TSL(Dox) hingegen zeigten bei Körpertemperatur eine lange Zirkulationszeit nach intravenöser (i.v.) Verabreichung. TSL(Dox) zeigten bei höherer Verabreichungsdosis eine verlängerte Zirkulationszeit. Wiederholte Injektionen mit TSL(Dox) nach 7 oder 14 Tagen, beeinflussten die Pharmakokinetik des Wirkstoffes nicht.

Durch chemische Vorbehandlung der Blase und anschließende Tumorzell-instillation wurde Tumorwachstum in der Blase erzeugt, das nach spätestens 5 Tagen zystoskopisch erkennbar war. Mit kontinuierlicher Spülung mit warmer Flüssigkeit konnte die Blase problemlos für die Behandlungsdauer von 1 h auf 41 °C erwärmt werden. Das Vorhandensein eines Tumors reduzierte die Dox-Aufnahme in die Blasenwand. Bei intravesikaler Therapie mit nicht liposomalem Dox wurden im Urothel bzw. der *Tunica muscularis* nur 78% bzw. 45% der Konzentration erreicht, die bei systemischen Injektion mit TSL(Dox) +HT erreicht wurde.

Die Therapie des Weichteilsarkoms mit Gem zeigte den Vorteil des liposomalen Einschlusses von Gem im Vergleich zum freien Wirkstoff. TSL(Gem) -HT zeigte eine geringfügigere Tumorwachstumsverzögerung verglichen mit freiem Gem ±HT. Die HT induzierte Wirkstofffreisetzung zeigte eine signifikante stärkere Inhibierung des Tumorwachstums verglichen mit allen anderen Gruppen.

Die Resultate zeigen, dass nicht alle Wirkstoffe für den Einschluss in auf DPPG₂ basierende Liposomen geeignet sind. Die Pharmakokinetik wird bei wiederholter Applikation nicht durch verstärkten Liposomenabbau

beeinflusst. TSL und HT zeigten Vorteile in der Anreicherung und Therapie in verschiedenen Tumormodellen. TSL in Kombination mit HT sind eine wertvolle Errungenschaft für die Krebstherapie und sollten weiter untersucht werden.

8 Summary

Targeted chemotherapy in solid tumors with thermosensitive liposomes in combination with doxorubicin, gemcitabine and mitomycin C

DPPG₂-based thermosensitive liposomes (TSL) in combination with local hyperthermia (HT) induced targeted drug delivery are a promising treatment strategy in anticancer therapy.

TSL, as a drug carrier system, can improve circulation half-life and accumulation of drugs in target tissue. The variety of cancer types show different therapy response to commonly used cytostatic agents. Therefore it would be advantageous to encapsulate different cytotoxic drugs into TSL for enhanced first line treatment. In this thesis mitomycin C (Mito) and gemcitabine (Gem) were newly encapsulated into TSL and were characterized *in vivo* and *in vitro*. The well tested TSL(Dox) were used to show superior *in vivo* properties compared to free drug in a novel orthotopic rat bladder cancer tumor model. Pharmacokinetic studies were performed to investigate the TSL formulations for stability, to evaluate dose dependency and to compare plasma half-life after repeated injection. Furthermore a new method for rat bladder tumor growth and hyperthermia treatment was developed. The aim was to show tissue distribution and bladder tumor accumulation after the treatment with TSL(Dox) and HT. The results were compared to those of a treatment with intravesical chemotherapy. TSL(Gem) were evaluated for antitumor activity in a subcutaneously growing soft tissue sarcoma model.

Liposomes were prepared by the lipid film hydration and extrusion method, followed by active or passive drug loading. TSL were characterized by dynamic light scattering, thin layer chromatography, phosphate assay, fluorescence spectroscopy and HPLC. *In vivo*-experiments were performed

under inhalation anesthesia in female F344 and male Brown Norway rats. HT treatment was performed by light exposure or warm rinse water.

For TSL(Mito) low encapsulation efficacy and poor *in-vitro* and *in-vivo*-stability even at low temperatures was found. TSL(Gem) and TSL(Dox) showed long circulation half-lives at body temperature after intravenous (i.v.) injection. For TSL(Dox) an increase in circulation time was observed at higher dose. A repeated injection of TSL(Dox) after 7 or 14 days did not influence pharmacokinetic parameter of the drug.

Chemical preconditioning of the bladder and following tumor cell instillation generated bladder tumor growth observable by cystoscopy at least after 5 days. A continuous warm liquid flow was feasible to heat the bladder to 41 °C, for the treatment period of 1 h. Tumor appearance in the bladder is combined with a decrease in Dox uptake into the bladder wall. Intravesical therapy with non-liposomal Dox reached in the urothelium and the muscle layer only 78% and 45% of the concentration achieved with i.v. injected TSL(Dox) +HT, respectively.

The therapeutic study with Gem in the rat soft tissue sarcoma demonstrated advantages for liposomal encapsulation over application of free drug. TSL(Gem) -HT showed only small retardation in tumor growth delay over non liposomal Gem \pm HT. HT triggered drug release showed significant increase in tumor growth inhibition compared to all other groups.

The results show that there is a possibility for successful encapsulation of different drugs into TSL, but not all drugs are suitable. Pharmacokinetic was not influenced by faster degradation after repeated injections. TSL +HT showed advantages in accumulation and therapy in different tumor models. TSL in combination with HT are a feasible tool in cancer therapy and should further be evaluated.

9 Literaturverzeichnis

- [1] World Health Organization, All Cancers (excluding non-melanoma skin cancer) Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx, accessed 23 February 2014.
- [2] Robert Koch Institut, Krebs im internationalen Vergleich, 2014, http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/ZfKD/Aktuelles/weltkrebstagg_2014.html;jsessionid=761FD41611AD9F077BF27C1E1B0DD198.2_cid372, accessed 23 February 2014.
- [3] R.D. Issels, L.H. Lindner, J. Verweij, P. Wust, P. Reichardt, B.-C. Schem, S. Abdel-Rahman, S. Daugaard, C. Salat, C.-M. Wendtner, Z. Vujaskovic, R. Wessalowski, K.-W. Jauch, H.R. Dürr, F. Ploner, A. Baur-Melnyk, U. Mansmann, W. Hiddemann, J.-Y. Blay, P. Hohenberger, Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study, *Lancet Oncol.* 11 (2010) 561–570.
- [4] D. Peer, J.M. Karp, S. Hong, O.C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy, *Nat Nanotechnol* 2 (2007) 751–760.
- [5] V. Wagner, A. Dullaart, A.-K. Bock, A. Zweck, The emerging nanomedicine landscape, *Nat. Biotechnol.* 24 (2006) 1211–1217.
- [6] L.H. Lindner, M. Hossann, Factors affecting drug release from liposomes, *Curr Opin Drug Discov Devel* 13 (2010) 111–123.
- [7] A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.* 13 (1965) 238–252.
- [8] G. van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 112–124.
- [9] O.G. Mouritsen, Lipids, curvature, and nano-medicine, *Eur J Lipid Sci Technol* 113 (2011) 1174–1187.
- [10] Seynhaeve, Ann L B, S. Hoving, D. Schipper, C.E. Vermeulen, de Wiel-Ambagtsheer, Gisela aan, van Tiel, Sandra T, Eggermont, Alexander M M, ten Hagen, Timo L M, Tumor necrosis factor alpha mediates

- homogeneous distribution of liposomes in murine melanoma that contributes to a better tumor response, *Cancer Res.* 67 (2007) 9455–9462.
- [11] M.B. Yatvin, J.N. Weinstein, W.H. Dennis, R. Blumenthal, Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia, *Science* 202 (1978) 1290–1293.
- [12] L.H. Lindner, M.E. Eichhorn, H. Eibl, N. Teichert, M. Schmitt-Sody, R.D. Issels, M. Dellian, Novel temperature-sensitive liposomes with prolonged circulation time, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 2168–2178.
- [13] J.P. May, M.J. Ernsting, E. Undzys, S.-D. Li, Thermosensitive liposomes for the delivery of gemcitabine and oxaliplatin to tumors, *Mol. Pharm.* 10 (2013) 4499–4508.
- [14] J.K. Mills, D. Needham, Lysolipid incorporation in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes enhances the ion permeability and drug release rates at the membrane phase transition, *Biochim. Biophys. Acta* 1716 (2005) 77–96.
- [15] C.D. Landon, J.-Y. Park, D. Needham, M.W. Dewhirst, Nanoscale Drug Delivery and Hyperthermia: The Materials Design and Preclinical and Clinical Testing of Low Temperature-Sensitive Liposomes Used in Combination with Mild Hyperthermia in the Treatment of Local Cancer, *Open Nanomed J* 3 (2011) 38–64.
- [16] Rebecca Schmidt, Neuartige Thermosensitive Liposomen zur zielgerichteten Therapie solider Tumoren: - Charakterisierung in vitro und in vivo -. Dissertation, München, 2011.
- [17] M. Hossann, T. Wang, M. Wiggenhorn, R. Schmidt, A. Zengerle, G. Winter, H. Eibl, M. Peller, M. Reiser, R.D. Issels, L.H. Lindner, Size of thermosensitive liposomes influences content release, *J Control Release* 147 (2010) 436–443.
- [18] C.F. Thorn, C. Oshiro, S. Marsh, T. Hernandez-Boussard, H. McLeod, T.E. Klein, R.B. Altman, Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects, *Pharmacogenet. Genomics* 21 (2011) 440–446.
- [19] D.A. Gewirtz, A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin, *Biochem. Pharmacol.* 57 (1999) 727–741.

- [20] A. Bodley, L.F. Liu, M. Israel, R. Seshadri, Y. Koseki, F.C. Giuliani, S. Kirschenbaum, R. Silber, M. Potmesil, DNA topoisomerase II-mediated interaction of doxorubicin and daunorubicin congeners with DNA, *Cancer Res.* 49 (1989) 5969–5978.
- [21] Rote Liste Service GmbH, Arzneimittelinformation für Deutschland: Adrimedac 2 mg/ml, 2013.
- [22] A. Arlt, A. Gehrz, S. Muerköster, J. Vorndamm, M.-L. Kruse, U.R. Fölsch, H. Schäfer, Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death, *Oncogene* 22 (2003) 3243–3251.
- [23] E. Mini, S. Nobili, B. Caciagli, I. Landini, T. Mazzei, Cellular pharmacology of gemcitabine, *Ann. Oncol.* 17 Suppl 5 (2006) v7-12.
- [24] V. Heinemann, Y.Z. Xu, S. Chubb, A. Sen, L.W. Hertel, G.B. Grindey, W. Plunkett, Cellular elimination of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate: a mechanism of self-potential, *Cancer Res.* 52 (1992) 533–539.
- [25] Arzneimittelinformation für Deutschland, Gemzar 38 mg/ml, 2013.
- [26] T. HATA, T. HOSHI, K. KANAMORI, A. MATSUMAE, Y. SANO, T. SHIMA, R. SUGAWARA, Mitomycin, a new antibiotic from *Streptomyces*. I, *J. Antibiot.* 9 (1956) 141–146.
- [27] S.T. Crooke, W.T. Bradner, Mitomycin C: a review, *Cancer Treat. Rev.* 3 (1976) 121–139.
- [28] M.M. Paz, X. Zhang, J. Lu, A. Holmgren, A new mechanism of action for the anticancer drug mitomycin C: mechanism-based inhibition of thioredoxin reductase, *Chem. Res. Toxicol.* 25 (2012) 1502–1511.
- [29] M. Tomasz, Y. Palom, The mitomycin bioreductive antitumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity, *Pharmacol. Ther.* 76 (1997) 73–87.
- [30] Rote Liste Service GmbH, Arzneimittelinformation für Deutschland: Mitomycin medac, 2013.
- [31] M.W. Dewhirst, Z. Vujaskovic, E. Jones, D. Thrall, Re-setting the biologic rationale for thermal therapy, *Int J Hyperthermia* 21 (2005) 779–790.
- [32] van der Zee, J, Heating the patient: a promising approach?, *Ann. Oncol.* 13 (2002) 1173–1184.

- [33] J.P. May, S.-D. Li, Hyperthermia-induced drug targeting, *Expert Opin Drug Deliv* 10 (2013) 511–527.
- [34] A. Partanen, P.S. Yarmolenko, A. Viitala, S. Appanaboyina, D. Haemmerich, A. Ranjan, G. Jacobs, D. Woods, J. Enholm, B.J. Wood, M.R. Dreher, Mild hyperthermia with magnetic resonance-guided high-intensity focused ultrasound for applications in drug delivery, *Int J Hyperthermia* 28 (2012) 320–336.
- [35] N.M. Hijnen, E. Heijman, M.O. Köhler, M. Ylihautala, G.J. Ehnholm, A.W. Simonetti, H. Grüll, Tumour hyperthermia and ablation in rats using a clinical MR-HIFU system equipped with a dedicated small animal set-up, *Int J Hyperthermia* 28 (2012) 141–155.
- [36] P. Novák, E.G. Moros, J.J. Parry, B.E. Rogers, R.J. Myerson, A. Zeug, J.E. Locke, R. Rossin, W.L. Straube, A.K. Singh, Experience with a small animal hyperthermia ultrasound system (SAHUS): report on 83 tumours, *Phys Med Biol* 50 (2005) 5127–5139.
- [37] S. Limmer, J. Hahn, R. Schmidt, K. Wachholz, A. Zengerle, K. Lechner, H. Eibl, R.D. Issels, M. Hossann, L.H. Lindner, Gemcitabine Treatment of Rat Soft Tissue Sarcoma with Phosphatidylglycerol-Based Thermosensitive Liposomes, *Pharm Res* (2014).
- [38] K. Morita, F. Zywietz, K. Kakinuma, R. Tanaka, M. Katoh, Efficacy of doxorubicin thermosensitive liposomes (40 degrees C) and local hyperthermia on rat rhabdomyosarcoma, *Oncol. Rep.* 20 (2008) 365–372.
- [39] M. Peller, V. Kurze, R. Loeffler, S. Pahernik, M. Dellian, A.E. Goetz, R. Issels, M. Reiser, Hyperthermia induces T1 relaxation and blood flow changes in tumors. A MRI thermometry study in vivo, *Magn Reson Imaging* 21 (2003) 545–551.
- [40] L.H. Lindner, R.D. Issels, Hyperthermia in soft tissue sarcoma, *Curr Treat Options Oncol* 12 (2011) 12–20.
- [41] K. Ahmed, S.F. Zaidi, Treating cancer with heat: hyperthermia as promising strategy to enhance apoptosis, *J Pak Med Assoc* 63 (2013) 504–508.

- [42] V. Milani, E. Noessner, Effects of thermal stress on tumor antigenicity and recognition by immune effector cells, *Cancer Immunol. Immunother.* 55 (2006) 312–319.
- [43] K.E. Tschoep-Lechner, V. Milani, F. Berger, N. Dieterle, S. Abdel-Rahman, C. Salat, R.-D. Issels, Gemcitabine and cisplatin combined with regional hyperthermia as second-line treatment in patients with gemcitabine-refractory advanced pancreatic cancer, *Int J Hyperthermia* 29 (2013) 8–16.
- [44] A.A. Manzoor, L.H. Lindner, C.D. Landon, J.-Y. Park, A.J. Simnick, M.R. Dreher, S. Das, G. Hanna, W. Park, A. Chilkoti, G.A. Koning, ten Hagen, Timo L M, D. Needham, M.W. Dewhirst, Overcoming limitations in nanoparticle drug delivery: triggered, intravascular release to improve drug penetration into tumors, *Cancer Res.* 72 (2012) 5566–5575.
- [45] P. Milla, C. Fiorito, F. Soria, S. Arpicco, L. Cattel, P. Gontero, Intravesical thermo-chemotherapy based on conductive heat: a first pharmacokinetic study with Mitomycin C in superficial transitional cell carcinoma patients, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 73 (2014) 503–509.
- [46] S.M. Cohen, Urinary bladder carcinogenesis with N-substituted aryl compounds: initiation and promotion, *Natl Cancer Inst Monogr* (1981) 63–67.
- [47] R.L. Marquet, H. Schellekens, D.L. Westbroek, J. Jeekel, Effect of treatment with interferon and cyclophosphamide on the growth of a spontaneous liposarcoma in rats, *Int. J. Cancer* 31 (1983) 223–226.
- [48] W.J. Kort, I.M. Weijma, A.M. Bijma, van Schalkwijk, W P, F.J. Zijlstra, D.L. Westbroek, Growth of an implanted fibrosarcoma in rats is associated with high levels of plasma prostaglandin-E2 and thromboxane-B2, *Prostaglandins Leukot Med* 28 (1987) 25–34.
- [49] S. Hoving, F. Brunstein, aan de Wiel-Ambagtsheer, Gisela, van Tiel, Sandra T, G. de Boeck, de Bruijn, Ernst A, Eggermont, Alexander M M, ten Hagen, Timo L M, Synergistic antitumor response of interleukin 2 with melphalan in isolated limb perfusion in soft tissue sarcoma-bearing rats, *Cancer Res.* 65 (2005) 4300–4308.
- [50] ten Hagen, Timo L M, Seynhaeve, Ann L B, van Tiel, Sandra T, D.J. Ruiter, Eggermont, Alexander M M, Pegylated liposomal tumor necrosis

- factor-alpha results in reduced toxicity and synergistic antitumor activity after systemic administration in combination with liposomal doxorubicin (Doxil) in soft tissue sarcoma-bearing rats, *Int. J. Cancer* 97 (2002) 115–120.
- [51] M.S. Martin, F. Martin, R. Michiels, H. Bastien, E. Justrabo, M. Bordes, B. Viry, An experimental model for cancer of the colon and rectum. Intestinal carcinoma induced in the rat 1,2-dimethylhydrazine, *Digestion* 8 (1973) 22–34.
- [52] M. Hossann, M. Wiggenghorn, A. Schwerdt, K. Wachholz, N. Teichert, H. Eibl, R.D. Issels, L.H. Lindner, In vitro stability and content release properties of phosphatidylglyceroglycerol containing thermosensitive liposomes., *Biochim Biophys Acta* 1768 (2007) 2491–2499.
- [53] C. Bornmann, R. Graeser, N. Esser, V. Zirolì, P. Jantscheff, T. Keck, C. Unger, U.T. Hopt, U. Adam, C. Schaechtele, U. Massing, E. von Dobschuetz, A new liposomal formulation of Gemcitabine is active in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer accessible to bioluminescence imaging, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 61 (2008) 395–405.
- [54] J. Woo, Chiu, Gigi N C, G. Karlsson, E. Wasan, L. Ickenstein, K. Edwards, M.B. Bally, Use of a passive equilibration methodology to encapsulate cisplatin into preformed thermosensitive liposomes, *Int J Pharm* 349 (2008) 38–46.
- [55] H. Eibl, Synthesis of glycerophospholipids, *Chem. Phys. Lipids* 26 (1980) 405–429.
- [56] S. El Khatib, S. Berrahmoune, A. Leroux, L. Bezdetnaya, F. Guillemín, M.-A. D'Hallewin, A novel orthotopic bladder tumor model with predictable localization of a solitary tumor, *Cancer Biol. Ther.* 5 (2006) 1327–1331.
- [57] K. Hendricksen, J. Molkenboer-Kuenen, E. Oosterwijk, Hulsbergen-van de Kaa, Christina A, J.A. Witjes, Evaluation of an orthotopic rat bladder urothelial cell carcinoma model by cystoscopy, *BJU Int.* 101 (2008) 889–893.
- [58] S. Postius, I. Szelenyi, In vivo rat bladder: a new model to screen spasmolytic compounds, *J Pharmacol Methods* 9 (1983) 53–61.

- [59] P. Galettis, J. Boutagy, D.D. Ma, Daunorubicin pharmacokinetics and the correlation with P-glycoprotein and response in patients with acute leukaemia, *Br. J. Cancer* 70 (1994) 324–329.
- [60] H.S. Schwartz, G.B. Grindey, Adriamycin and daunorubicin: a comparison of antitumor activities and tissue uptake in mice following immunosuppression, *Cancer Res.* 33 (1973) 1837–1844.
- [61] C. Lanz, M. Früh, W. Thormann, T. Cerny, B.H. Lauterburg, Rapid determination of gemcitabine in plasma and serum using reversed-phase HPLC, *J Sep Sci* 30 (2007) 1811–1820.
- [62] Zutphen et al. (Ed.), *Grundlagen der Versuchstierkunde*, 1st ed., Gustav Fischer Verlag, 1995.
- [63] Z. Xiao, T.J. McCallum, K.M. Brown, G.G. Miller, S.B. Halls, I. Parney, R.B. Moore, Characterization of a novel transplantable orthotopic rat bladder transitional cell tumour model, *Br. J. Cancer* 81 (1999) 638–646.
- [64] *Arzneimittelinformation für Deutschland*, Doxorubicin Accord 2 mg/ml, 2013.
- [65] M.D. Shelley, M.D. Mason, H. Kynaston, Intravesical therapy for superficial bladder cancer: a systematic review of randomised trials and meta-analyses, *Cancer Treat. Rev.* 36 (2010) 195–205.
- [66] E.J. Kang, Y.J. Choi, J.S. Kim, S.T. Kim, K.H. Park, I.K. Choi, S.C. Oh, J.H. Seo, S.W. Shin, J.S. Kim, Y.H. Kim, Mitomycin-C, 5-fluorouracil, and leucovorin as a salvage therapy in patients with metastatic colorectal adenocarcinoma, *Asia Pac J Clin Oncol* 6 (2010) 286–291.
- [67] G.M. Hahn, J. Braun, I. Har-Kedar, Thermochemotherapy: synergism between hyperthermia (42-43 degrees) and adriamycin (of bleomycin) in mammalian cell inactivation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72 (1975) 937–940.
- [68] S.B. Field, C.C. Morris, The relationship between heating time and temperature: its relevance to clinical hyperthermia, *Radiother Oncol* 1 (1983) 179–186.
- [69] W.C. Dewey, Arrhenius relationships from the molecule and cell to the clinic, *Int J Hyperthermia* 10 (1994) 457–483.

- [70] S.A. Sapareto, L.E. Hopwood, W.C. Dewey, M.R. Raju, J.W. Gray, Effects of hyperthermia on survival and progression of Chinese hamster ovary cells, *Cancer Res.* 38 (1978) 393–400.
- [71] van der Heijden, Antoine G, Jansen, Cornelius F J, G. Verhaegh, M.A. O'donnell, J.A. Schalken, J.A. Witjes, The effect of hyperthermia on mitomycin-C induced cytotoxicity in four human bladder cancer cell lines, *Eur. Urol.* 46 (2004) 670–674.
- [72] C. van Bree, C. Beumer, H.M. Rodermond, J. Haveman, P.J. Bakker, Effectiveness of 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) combined with hyperthermia in rat R-1 rhabdomyosarcoma in vitro and in vivo, *Int J Hyperthermia* 15 (1999) 549–556.
- [73] J. Haveman, R.C. Rietbroek, A. Geerdink, J. van Rijn, P.J. Bakker, Effect of hyperthermia on the cytotoxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) in cultured SW1573 cells, *Int. J. Cancer* 62 (1995) 627–630.
- [74] S. Adachi, S. Kokura, T. Okayama, T. Ishikawa, T. Takagi, O. Handa, Y. Naito, T. Yoshikawa, Effect of hyperthermia combined with gemcitabine on apoptotic cell death in cultured human pancreatic cancer cell lines, *Int J Hyperthermia* 25 (2009) 210–219.
- [75] SciFinder®, Mitomycin C: CAS Nr. 50-07-7, 2014, accessed 25 February 2014.
- [76] J.H. Beijnen, W. Underberg, Degradation of mitomycin C in acidic solution, *International Journal of Pharmaceutics*, (1985) 219–229.
- [77] M. Hossann, T. Wang, M. Wiggenhorn, R. Schmidt, A. Zengerle, G. Winter, H. Eibl, M. Peller, M. Reiser, R.D. Issels, L.H. Lindner, Size of thermosensitive liposomes influences content release, *J Control Release* 147 (2010) 436–443.
- [78] A.A. Gabizon, D. Tzemach, A.T. Horowitz, H. Shmeeda, J. Yeh, S. Zalipsky, Reduced toxicity and superior therapeutic activity of a mitomycin C lipid-based prodrug incorporated in pegylated liposomes, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 1913–1920.
- [79] A. Gabizon, D. Tzemach, L. Mak, M. Bronstein, A.T. Horowitz, Dose dependency of pharmacokinetics and therapeutic efficacy of pegylated

- liposomal doxorubicin (DOXIL) in murine models, *J Drug Target* 10 (2002) 539–548.
- [80] P. Laverman, M.G. Carstens, O.C. Boerman, E.T. Dams, W.J. Oyen, N. van Rooijen, F.H. Corstens, G. Storm, Factors affecting the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-liposomes upon repeated injection, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298 (2001) 607–612.
- [81] T. Ishida, M. Harada, X.Y. Wang, M. Ichihara, K. Irimura, H. Kiwada, Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes following preceding liposome injection: effects of lipid dose and PEG surface-density and chain length of the first-dose liposomes, *J Control Release* 105 (2005) 305–317.
- [82] Abu Lila, Amr S, H. Kiwada, T. Ishida, The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: clinical challenge and approaches to manage, *J Control Release* 172 (2013) 38–47.
- [83] E.T. Dams, P. Laverman, W.J. Oyen, G. Storm, G.L. Scherphof, van Der Meer, J W, F.H. Corstens, O.C. Boerman, Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292 (2000) 1071–1079.
- [84] M. Hossann, Z. Syunyaeva, R. Schmidt, A. Zengerle, H. Eibl, R.D. Issels, L.H. Lindner, Proteins and cholesterol lipid vesicles are mediators of drug release from thermosensitive liposomes, *J Control Release* 162 (2012) 400–406.
- [85] S. Salahi, P.F. Maccarini, D.B. Rodrigues, W. Etienne, C.D. Landon, B.A. Inman, M.W. Dewhirst, P.R. Stauffer, Miniature microwave applicator for murine bladder hyperthermia studies, *Int J Hyperthermia* 28 (2012) 456–465.
- [86] J. Haveman, Smals, O A G, H.M. Rodermond, Effects of hyperthermia on the rat bladder: a pre-clinical study on thermometry and functional damage after treatment, *Int J Hyperthermia* 19 (2003) 45–57.
- [87] D. Papahadjopoulos, A. Gabizon, Liposomes designed to avoid the reticuloendothelial system, *Prog. Clin. Biol. Res.* 343 (1990) 85–93.
- [88] A. Kanai, J. Roppolo, Y. Ikeda, I. Zabbarova, C. Tai, L. Birder, D. Griffiths, W. de Groat, C. Fry, Origin of spontaneous activity in neonatal

- and adult rat bladders and its enhancement by stretch and muscarinic agonists, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 292 (2007) F1065-72.
- [89] M.G. Wientjes, J.T. Dalton, R.A. Badalament, J.R. Drago, J.L. Au, Bladder wall penetration of intravesical mitomycin C in dogs, *Cancer Res.* 51 (1991) 4347–4354.
- [90] M.G. Wientjes, R.A. Badalament, J.L. Au, Penetration of intravesical doxorubicin in human bladders, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 37 (1996) 539–546.
- [91] M.G. Wientjes, R.A. Badalament, R.C. Wang, F. Hassan, J.L. Au, Penetration of mitomycin C in human bladder, *Cancer Res.* 53 (1993) 3314–3320.
- [92] L.E. Gerlowski, R.K. Jain, Physiologically based pharmacokinetic modeling: principles and applications, *J Pharm Sci* 72 (1983) 1103–1127.
- [93] S. Stapleton, M. Milosevic, C. Allen, J. Zheng, M. Dunne, I. Yeung, D.A. Jaffray, A mathematical model of the enhanced permeability and retention effect for liposome transport in solid tumors, *PLoS ONE* 8 (2013) e81157.
- [94] H. Maeda, The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting, *Adv. Enzyme Regul.* 41 (2001) 189–207.
- [95] N.Z. Wu, D. Da, T.L. Rudoll, D. Needham, A.R. Whorton, M.W. Dewhirst, Increased microvascular permeability contributes to preferential accumulation of Stealth liposomes in tumor tissue, *Cancer Res.* 53 (1993) 3765–3770.
- [96] C. van Bree, C. Beumer, H.M. Rodermond, J. Haveman, P.J. Bakker, Effectiveness of 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) combined with hyperthermia in rat R-1 rhabdomyosarcoma in vitro and in vivo, *Int J Hyperthermia* 15 (1999) 549–556.
- [97] L. Li, ten Hagen, Timo L M, M. Bolkestein, A. Gasselhuber, J. Yatvin, van Rhoon, Gerard C, Eggermont, Alexander M M, D. Haemmerich, G.A. Koning, Improved intratumoral nanoparticle extravasation and penetration by mild hyperthermia, *J Control Release* 167 (2013) 130–137.

- [98] R. Moog, A.M. Burger, M. Brandl, J. Schöler, R. Schubert, C. Unger, H.H. Fiebig, U. Massing, Change in pharmacokinetic and pharmacodynamic behavior of gemcitabine in human tumor xenografts upon entrapment in vesicular phospholipid gels, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 49 (2002) 356–366.
- [99] J. Long, Y. Zhang, X. Yu, J. Yang, D.G. LeBrun, C. Chen, Q. Yao, M. Li, Overcoming drug resistance in pancreatic cancer, *Expert Opin. Ther. Targets* 15 (2011) 817–828.
- [100] R. Grunewald, H. Kantarjian, M.J. Keating, J. Abbruzzese, P. Tarassoff, W. Plunkett, Pharmacologically directed design of the dose rate and schedule of 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) administration in leukemia, *Cancer Res.* 50 (1990) 6823–6826.
- [101] M. Tempero, W. Plunkett, Ruiz Van Haperen, Veronique, J. Hainsworth, H. Hochster, R. Lenzi, J. Abbruzzese, Randomized phase II comparison of dose-intense gemcitabine: thirty-minute infusion and fixed dose rate infusion in patients with pancreatic adenocarcinoma 21 (2003) 3402–3408.
- [102] Bashkatov, A. N., Genina, E. A., Kochubey, V. I., Tuchin, V. V., Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 38 (2005) 2543–2555.

10 Anhang

10.1 *Materialien*

10.1.1 Liposomen

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
Ammoniak 25%	DC	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	Phosphatbestimmung	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ammoniumsulfat, Sigma Ultra 99%		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Chloroform p.A.	Lösen Lipide	Merck KGaA, Darmstadt, D
Citronensäure Monohydrat	Liposomenherstellung	Merck KGaA, Darmstadt, D
Eisessig, Eisessigsäure 99-100%	DC	Merck KGaA, Darmstadt, D
Hepes p.A.	Pufferzusatz	Biomol GmbH, Hamburg, D
L-Histidin	Liposomenherstellung	Carl Roth GMBH + Co. KG, Karlsruhe; D
NaCl 99,5% p.A.	Liposomenherstellung/ Charakterisierung	Carl Roth GMBH + Co. KG, Karlsruhe; D
Methanol p.A.	Liposomenherstellung	Carl Roth GMBH + Co. KG, Karlsruhe, D
Methanol p.A., ROTISOLV® HPLC Gradient Grade	DC	Carl Roth GMBH + Co. KG, Karlsruhe
Molybdän(VI)-oxid, 99,5%	DC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Molybdän Pulver, ≥99,9%	DC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Ortho-Phosphorsäure, 85%	DC	Merck KGaA, Darmstadt, D
Perchlorsäure 70% p.A.	Phosphatbestimmung	Merck KGaA, Darmstadt, D
Sephadex® G-50	Liposomenherstellung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) 95-97% p.A.	Phosphatbestimmung	Merck KGaA, Darmstadt, D
Stickstoff	Extrusion	Linde AG, Pullach, D
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄),	DC	Merck KGaA,

EMPURE		Darmstadt, D
Triton X-100	Phosphatbestimmung	Carl Roth GMBH + Co. KG, Karlsruhe, D

Tabelle 23 - Übersicht Chemikalien für die Liposomenherstellung und Charakterisierung

Alle selbsthergestellten Reagenzien wurden mit Reinstwasser aus der AquaMillipore® Anlage (Milli-Q Advantage, Merck Millipore) hergestellt.

Bezeichnung	Verwendungszweck	Zusammensetzung
Citratpuffer pH 4,0	Herstellung Liposomen	300 mM Citrat pH 4,0
DC-Lösung I	DC	Chloroform:Methanol 1:1 (vol/vol)
DC-Lösung II	DC	Chloroform:Methanol 1:3 (vol/vol)
DC-Lösung III	DC	Chloroform:Methanol 9:1 (vol/vol)
Histidin-Puffer pH 6,4	Charakterisierung Liposomen	20 mM L-Histidin 150 mM NaCl Aqua Millipore® pH 6,4 (NaOH)
HN-Puffer pH 7,4	Herstellung/ Charakterisierung Liposomen	20 mM Hepes 150 mM NaCL Aqua Millipore® pH 7,4 (NaOH)
HN-Puffer pH 7,8	Herstellung/ Charakterisierung Liposomen	20 mM Hepes 150 mM NaCL Aqua Millipore® pH 7,8 (NaOH)
Laufmittel 1	DC	100 ml Chloroform 60 ml Methanol 20 ml Eisessig 5 ml Wasser
Lipidstandard	DC	20 mM P-Lyso-PC/ DPPC/ DPPG ₂ / DSPE-PEG2000 Chloroform/Methanol 9:1
Physiologische Kochsalzlösung 0,9%	DC	4,5g NaCl Wasserad 500 ml
Phosphatlösung I	Phosphatbestimmung	35,3 g H ₂ SO ₄ 95-97% p.A. Aqua Millipore® ad 100ml
Phosphatlösung II	Phosphatbestimmung	3 g Ammoniumheptamolybdat- Tetrahydrat 120 µl Triton X-100 Aqua Millipore® ad 100ml
Phosphor ICP Standard 1000	Phosphatbestimmung	Merck KGaA, Darmstadt; D

mg/l Phosphor Phosphat- Standard 1000	Phosphatbestimmung	Merck KGaA, Darmstadt; D
mg/l Phosphat Standardlösung I, Phosphat Standard	Phosphatbestimmung	Merck KGaA, Darmstadt; D 1000 mg/l Phosphat, 10,53 mM
Standardlösung II, Phosphor ICP Standard	Phosphatbestimmung	Merck KGaA, Darmstadt; D 1000 mg/l Phosphor, 32,29 mM
Sephadex	Herstellung Liposomen	10 g Sephadex® G-50 0,9% NaCl-Lösung ad 150 ml
Triton 10%	Konzentrationsbestimmung Doxorubicin	10 g Triton X-100 Aqua Millipore® ad 100ml

Tabelle 24 - Übersicht Reagenzien für die Liposomenherstellung und Charakterisierung

Bezeichnung	Bezugsquelle
Combitips® plus	Eppendorf AG, Hamburg, D
Einmalküvetten, Plastik, PLASTIBRAND	Spectrum® Laboratories, DG
Makro PMMA	Breda, NL
Eppendorf Tubes®	Eppendorf AG, Hamburg, D
Falcon™ Röhrchen	BD, Heidelberg, D
Glaswolle, extra fein	Karl Hecht GmbH, Sondheim, D
DC-Platten, Kieselgel 60, nicht modifiziert, 10x20 cm	Merck KGaA, Darmstadt, D
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, D
Pipettenspitzen epT.I.P.S.®	Eppendorf AG, Hamburg, Germany

Tabelle 25 - Übersicht Verbrauchsmaterial für die Liposomenherstellung und Charakterisierung

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
Fluoreszenz- spektrometer, Varian	Konzentrations- bestimmung	Varian medical system, Palo Alto, CA
Cary Eclipse	Doxorubicin	
Digitaler Vakuumregler	Herstellung Lipidfilm	Heidolph Instruments
Vac Control Automatic		GmbH & Co. KG, Schwabach, D
AS		
Extruder Lipex™	Extrusion	Northern Lipids Inc., Burnaby, CA
Feinwaage Precisa 205	Einwiegen Lipide	Precisa Gravimetrics
A SCS		AG, Dietikon, CH
Heizblock, Pierce	DC	Thermo Fisher Scientific
Reacti-Therm No.		GmbH, Schwerte, D

18790		
Heizblock Typ 53 LS 6301	Phosphatbestimmung	Gebr. Liebisch GmbH Co. KG, Bielefeld, D
High Speed Zentrifuge, Avanti-J26XP, Rotor JA.25.50	Herstellung Liposomen	Beckman Coulter; Krefeld, D
Magnetrührer mit Heizplatte, VMS-A	DC	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Multipette stream [®]	Pipettieren	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettierhilfe Pipetus [®] -Akku	Pipettieren	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, D
Pipetten	Pipettieren	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pierce Reacti-Vap [™] Bedampfungseinheit	DC	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Rotationsverdampfer Laborota 4001	Herstellung Lipidfilm	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Spektrophotometer UV/VIS, Beckmann DU 640	Phosphatbestimmung	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D
Thermomixer comfort	Herstellung/ Charakterisierung Liposomen	Eppendorf AG, Hamburg, D
Vakuum-Exsikkator, Nalgene [™]	Lagerung Lipidfilm	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Vakuum Pumpe	Herstellung Lipidfilm	Arcotronics; Merg, D
Vortex Genie2	Herstellung/ Charakterisierung Liposomen	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zentrifuge, Eppendorf Centrifuge 5415D/5415C	Herstellung/ Charakterisierung Liposomen	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zentrifuge, Eppendorf Hermle ZK 380	Herstellung Liposomen/ DC	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zetasizer Nano ZS	Liposomengröße/ Polidispersionsindex/ ζ -Potential	Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK
Waage, Precisa BJ6100D	Herstellung Liposomen	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH
Wärmebad, Pharmacia LKB-Multitemp II	Extrusion	Pharmacia AG, Dübendorf, CH

Tabelle 26 - Übersicht Geräte für die Liposomenherstellung und Charakterisierung

10.1.2 Zellkultur

Bezeichnung	Wirkstoff	Konzentration	Bezugsquelle
Adrimedac [®] / Doxorubicin Accord [®]	Doxorubicin	2 mg/ml	Bendalis GMBH/ medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH
Gemzar [®] Mitomycin medac [®]	Gemcitabin Mitomycin C	38 mg/ml 1 mg/ml	Lilly Deutschland GMBH medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH
Penicillin/ Streptomycin	Penicillin/ Streptomycin	10000 U/ml / 10000 µg/ml	Biochrom AG, Berlin, D

Tabelle 27 - Übersicht verwendete Medikamente in der Zellkultur

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
Dinatriumhydrogen- phosphat, wasserfrei	Mykoplasmentest; Mc Ilvaine's Puffer	Merck KGaA, Darmstadt, D
Dimethylsulfoxid	Mykoplasmentest; Fixiermittel	Merck KGaA, Darmstadt, D
Methanol	Mykoplasmentest; Fixiermittel	Carl Roth GMBH + Co. KG, Karlsruhe, D

Tabelle 28 - Übersicht verwendete Chemikalien in der Zellkultur

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
Cell Proliferation Agent (WST-1-Reagenz)	Zellviabilitätstest	Roche Diagnostics, Mannheim, D
4',6-Diamidin-2- phenylindo (DAPI)	Mykoplasmentest; Farbstoff	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Dulbecco's MEM, NaHCO ₃ gepuffert, mit stabilem Glutamin	Medium; DHD/K12/TRb	Biochrom AG, Berlin, D
Dulbecco's MEM, HEPES gepuffert, mit stabilem Glutamin	Medium für CO ₂ -freie Atmosphäre; DHD/K12/TRb	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
FCS	Zusatz Medium	Biochrom AG, Berlin, D
Ham's F10, ohne NaHCO ₃ ; mit stabilem Glutamin	Medium; DHD/K12/TRb	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Ham's F10, mit NaHCO ₃ und HEPES gepuffert, ohne Glutamin	Medium für CO ₂ -freie Atmosphäre; DHD/K12/TRb	Biochrom AG, Berlin, D
Isopropanol 70%	Desinfektion	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, D
PBS Dulbecco, ohne	Puffer	Biochrom AG, Berlin,

Ca ²⁺ ; ohne Mg ²⁺		D
RPMI 1640 Medium, NaHCO ₃ gepuffert, mit stabilem Glutamin	Medium; AY27; BN175	Biochrom AG, Berlin, D
Natronlauge 0,1 N	Mykoplasmentest; Mc Ilvaine's Puffer	Carl Roth GMBH + Co. KG, Karlsruhe, D
RPMI 1640 Medium, HEPES gepuffert; mit stabilem Glutamin	Medium für CO ₂ -freie Atmosphäre; AY27; BN175	Biochrom AG, Berlin, D
Trypsin/EDTA Solution 0,5%/ 0,2% (w/v)	Ablösen adhärenter Zellen	Biochrom AG, Berlin, D
Trypan blau 0,5% in physiologischer Kochsalzlösung	Zellfärbung	Biochrom AG, Berlin, D
Trypsin/EDTA Solution(0,5%/0,2%)	Zellkultivierung	Biochrom AG, Berlin, D

Tabelle 29 - Übersicht verwendete Reagenzien in der Zellkultur

Bezeichnung	Bezugsquelle
Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhäuser, D
Cryo Tube™	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, D
Einmal-Plastikpipetten	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, D
Eppendorf Tubes®	Eppendorf AG, Hamburg, D
Falcon™ Röhrchen	BD, Heidelberg, D
Gewebekulturflaschen; 175cm ² + 75cm ² ; Schräghals mit Filterkappe	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, D
Microtest™ TC Plates, 96 Well, Flachboden	BD, Heidelberg, D
Pasteurpipetten; Glas	Brand GMBH + CO KG, D
Pipettenspitzen epT.I.P.S.®	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Zellkulturschalen 60x15mm	Greiner Bio-One GmbH, D

Tabelle 30 - Übersicht verwendete Verbrauchsmaterial in der Zellkultur

Bezeichnung	Bezugsquelle
Absaugpumpe BVC 21	Vacuubrand GmbH + Co. KG, D
CO ₂ Inkubator	Binder, Tuttlingen, D
Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene™, -1°C/min	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte D
Digitalkamera Power Shot G9	Canon, Krefeld, D
Microplate Reader MRX	Dynatech Laboratories, USA
Mikroskop Axiovert 40 CFL mit DAPI- Filter, Anregung BP 365/12, Strahlenteiler FT 395, Emission LP 397	Zeiss, Jena, D
Mikroskop Olympus CH	Olympus Deutschland GmbH,

Pipetboy Comfort	Hamburg, D
Pipetten	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald, D
Sterilwerkbank	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Umwälzthermostat mit Wasserbad	Glaire BSB 4, ICN Flow, Eggenstein, D
Wasserbad	Edmund Bühler GmbH, Tübingen, D
Zählkammer Neubauer Improved, 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm ²	Memmert GmbH, Schwabach, D
Zentrifuge Labofuge 400 R	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg, D
	Haereus, Hanau, D

Tabelle 31 - Übersicht verwendete Geräte in der Zellkultur

10.1.3 Tierversuche

Bezeichnung	Wirkstoff	Konzentration	Bezugsquelle
Adrimedac [®] / Doxorubicin Accord [®]	Dox	2 mg/ml	Bendalis GMBH/ medac Gesellschaft für klinischeSpezialpräpa rate mbH
Bepanthen [®] Augen- und Nasensalbe	Dexpanthenol		Bayer Vital GmbH, Leverkusen, D
Conoxia [®] GO ₂ X Forene [®]	Sauerstoff Isofluran	100%	Linde AG, Pullach, D Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, D
Gemzar [®]	Gem	38 mg/ml	Lilly Deutschland GMBH
Heparin- Natrium	Hochmolekulare s Heparin	2500 IE/5ml	Ratiopharm GmbH, Ulm, D
Isotonische Kochsalzlösung	NaCl	0,9 %ig	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Metacam [®]	Meloxicam	5mg/kg	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH Co. KG, Ingelheim am Rhein, D
Mitomycin medac [®]	Mito	1 mg/ml	medac Gesellschaft für klinischeSpezialpräpa rate mbH
Narcoren [®]	Pentobarbital- Natrium	16g /100 ml	Merial GmbH, Halbergmoos, D
Octenisept [®]	Octenidin Hydrochlorid/	0,1 g/2 g/100 ml	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt,

PBS Dulbecco	Phenoxyethanol Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca^{2+} ; ohne Mg^{2+}		D Biochrom AG, Berlin, D
Vetalgin®	Metamizol-Natrium	500mg/ml	Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D
Tramal®	Tramadol	100 mg/ml	Grünenthal GmbH, Aachen, D

Tabelle 32 - Übersicht im Tierversuch eingesetzte Arzneimittel

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
Agarosegel	Blasenkarzinom	Carl Roth GMBH + Co. KG, Karlsruhe; D
Formaldehyd - Lösung 4%, CH_2O	Fixierung Gewebe	Microcos GmbH, Garching, D
Natronlauge, NaOH 0,1 N	Blasenkarzinom	Carl Roth GMBH + Co. KG, Karlsruhe, D
Salzsäure, HCl 0,1 N	Blasenkarzinom	Carl Roth GMBH + Co. KG, Karlsruhe, D
Silicon	Blasenkarzinom	Knauf Bauprodukte GmbH & Co. KG, Iphofen, D

Tabelle 33 - Übersicht im Tierversuch eingesetzte Reagenzien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Butterflykanülen, Safety-Lok™	BD, Heidelberg, D
Chirurgisches Nahtmaterial, PERMA HAND Seide, geflochten, 6-0, 16 mm 3/8c	Johnson & Johnson MEDICAL GmbH Ethicon Deutschland, Norderstedt, D
Einmal Skalpell	Feather Safty Razor CO LTD, Osaka, J
Eppendorf Tubes®	Eppendorf AG, Hamburg, D
Falcon™ Röhrchen	BD; Heidelberg; D
IN-Stopper	B. Braun Melsungen AG, Melsungen; D
Kanülen Leukosilk®	BD; Heidelberg, D BSN medical GmbH & Co. KG, Hamburg, G
Micro-Tupfer	Qosina Corporation, New York, USA
Microvette® 200	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
pH-Indikator Stäbchen, pH 0-14	Merck KGaA, Darmstadt, D
Pipettenspitzen epT.I.P.S.®	Eppendorf AG, Hamburg, Germany

Spritzen	BD, Heidelberg, D
Tupfer Maicell®	MaiMed GmbH, Neukirchen, D
Venenverweilkatheter	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Zellkulturschalen 60x15mm	Greiner Bio-One GmbH, D

Tabelle 34 - Übersicht im Tierversuch eingesetztes Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Bezugsquelle
Fiberoptisches Nadelarthroskop, TELE PACK X, 0° Grad Optik, Ø 1mm, Länge 6 cm, mit Zubehör	KARL STORZ GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D
Inhalationsnarkoseeinheit mit Zubehör	VetTech Solutions Ltd, Cheshire, UK
Kaltlichtquelle Optech PL 2000	PHOTONIC Optische Geräte GmbH&CoKG, Wien, AT
Mikroskop, Stereomikroskop, Auflicht	EXACTA+OPTECH GMBH, München, D
Pipetten	Eppendorf AG; Hamburg, D
Präzisionswaage, PFB 6000-1	Kern & Sohn GmbH, Balingen, D
Rollerpumpe, Infusomat 870202	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Schermaschine Contura	Wella AG, Darmstadt, D
Temperatur-Datenlogger, Voltcraft K204 mit Temperatursonden GTF 101 und GTF 300 NiCr-Ni (Typ K)	ATP Messtechnik GmbH, Ettenheim, D
Thermomixbad 1400 für HT Blase, 2 l, mit Thermomix 1419	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Umwälzthermostad	
Wasserbad HT Hintergliedmaße, JB Aqua 26L	Grant Instruments, Cambridgeshire, UK
Wasserbad Julabo U3 für Matte, mit Einhängethermostat, 4,3 l	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, D
Wassermatte HICO-Polyurethan-Matte, 50x30 cm	Hirtz & Co. KG, Köln, D
Zentrifuge, 5451	Eppendorf AG, Hamburg, Germany

Tabelle 35 - Übersicht im Tierversuch eingesetzte Geräte

10.1.4 HPLC Analytik

Alle Selbsthergestellten Reagenzien wurden mit Reinstwasser aus der AquaMillipore® Anlage (Milli-Q Advantage, Merck Millipore)

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
Acetonitril	Laufmittel Dox, Mit	J.T Baker-Avantor Performance Materials, Center Valley, USA

Chloroform	Dox Bestimmung im Gewebe	ACROS ORGANICS-Thermo Fischer Scientific, Geel, B
Kaliumdihydrogenphosphat	Laufmittel Dox, Gem	Merck KGaA, Darmstadt, D
Methanol	Dox Bestimmung im Gewebe	J.T Baker-Avantor Performance Materials, Center Valley, USA
PBS Puffer	Wirkstoffnachweis im Plasma	Apotheke LMU Campus Innenstadt, München, D
Isopropanol	Wirkstoffnachweis im Plasma	J.T Baker-Avantor Performance Materials, Center Valley, USA
Silbernitrat	Dox Bestimmung im Gewebe	ACROS ORGANICS-Thermo Fischer Scientific, Geel, B

Tabelle 36 - Übersicht für HPLC Analytik eingesetzte Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
Adrimedac [®] / Doxorubicin Accord [®]	Referenzstandard Dox	Bendalis GMBH/ medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH
4'-Aminoacetophenon	Interner Standard Mito	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Daunorubicin [®]	Interner Standard Dox	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
5-Fluorouridin	Interner Standard Gem	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Gemzar [®]	Referenzstandard Gem	Lilly Deutschland GMBH
Mitomycin medac [®]	Referenzstandard Mito	medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH

Tabelle 37 - Übersicht für HPLC Analytik eingesetzte Standards

Bezeichnung	Bezugsquelle
Autoinjektorröhrchen mit Stopfen	Wicom Germany GmbH, Heppenheim, D
Aqua C18 - Säule, 250 mm x 4,6 mm innerer Durchmesser, 5 µl Partikelgröße, Porengröße 125 Å (Dox, Mit)	Phenomenex Ltd., Aschaffenburg, D
Eppendorf Tubes [®]	Eppendorf AG, Hamburg, D
Kinetex C18 - Säule, 3 mm x 100 mm innerer Durchmesser, 2,6 µm Partikelgröße, Porengröße 100 Å (Gem)	Phenomenex Ltd., Aschaffenburg, D
Mikroeinsätze mit Polymerfuß	Chromatographie Handel Müller,

Chromatographie	Fridolfing;D
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, D
Pipettenspitzen epT.I.P.S.®	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Wolframkarbid-Kugeln 3 mm	Qiagen GmbH, Hilden, D
Vorsäuleneinsätze	Waters HPLC, Eschborn, D
Zentrifugenröhrchen aus Glas	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, D

Tabelle 38 - Übersicht für HPLC Analytik eingesetztes Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Nachweis	Bezugsquelle
HPLC, 510 HPLC-Pumpe, 717plus	Dox	Waters HPLC, Eschborn, D
Autosampler, 470 Fluoreszenzdetektor		
HPLC, 515 HPLC-Pumpe, 717plus	Gem, Mito	Waters HPLC, Eschborn, D
Autosampler, UV Detektor 490E, mit Säulenofen		
Minifuge RF	Dox, Gem, Mito	Heraeus, Newport Pagnell, UK
Pierce Reacti-Vap™	Dox, Gem, Mito	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Bedampfungseinheit		
Pipetten	Dox, Gem, Mito	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Reacti-Therm Heizblock	Dox, Gem, Mito	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Reax2 Überkopfmischer	Dox, Gem, Mito	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
TissueLyser	Dox	Qiagen GmbH, Hilden, D
Vakuumkammer VISIPREP	Dox, Gem, Mito	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Vorsäulenhalter Guard-Pack	Dox, Mit	MedChrom GmbH, Flörsheim-Dalsheim, D
Vorsäulenhalter WATO 88141	Gem	Waters HPLC, Eschborn, D

Tabelle 39 - Übersicht für HPLC Analytik eingesetzte Geräte

10.1.5 Software

Bezeichnung	Anwendung
Cary Eclipse 1.1(132)	Fluoreszenzmessung Fluoreszenzspektrophotometrie
Citavi 4	Literaturverwaltung
IrfanView 4.28	Bildbearbeitung
Empower (Waters) Build 1154	HPLC
Gimp 2.6.11	DC Berechnung
ImageJ 1.47v	DC Berechnung
MS Office 2010	Textverarbeitung; Tabellenkalkulation; Graphen
Origin 8.5.1G	Datenanalyse, Grafiken, Statistik
Pubmed	Literaturrecherche
Revelation™ 4.22	WST1-Absorptionsmessung
Windows 7 Enterprise	Betriebssystem
Zetasizer Nano series software 7.03	Liposomengröße, Polydispersionsindex, ζ -Potential

Tabelle 40 - Verwendete Software; Bearbeitung und Auswertung

10.2 Abkürzungsverzeichnis

AUC ₀₋₁₂₀	Fläche unter der Plasmaspiegelkurve (engl. <i>area under the curve</i>)
AY27	Blasenkarzinom Zelllinie AY 27 der F344 Ratte
BN	Brown Norway Ratte
BN175	Weichteilsarkom Zelllinie der Brown Norway Ratte
C _{max}	theoretische maximale Konzentration
DAPI	4'6-Diamidin-2-Phenylindol
DC	Dünnschichtchromatographie
DHD/K12/TRb	Kolonkarzinom Zelllinie der BD-IX Ratte
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
Dox	Doxorubicin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPG	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
DPPG ₂	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglyceroglycerol
DSPC	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DSPE-PEG ₂₀₀₀	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy-amino(polyethelene-glycol)-2000]
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR-Effekt	passive Anreicherung (engl. <i>enhanced permeability and retention effect</i>)
F344	Fischer F344 Ratten
Gem	Gemcitabin
hcnT	konzentrationsgesteuerte Transporter (engl. <i>human concentrative nucleoside transporter</i>)
henT	equilibriumgesteuerte Nukleosid-Transporter (engl. <i>human equilibrative nucleoside transporter</i>)
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethanesulfonsäure)
HN-Puffer	Hepes-Kochsalz Puffer
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high pressure liquid chromatographie</i>)
HSP	Hitzeschockprotein

HT	Hyperthermie
i.v.	intravenös
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration (engl. <i>half maximal inhibitory concentration</i>)
Mito	Mitomycin C
n	Anzahl
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDI	Polidispersionsindex
PEG	Polyethylenglykol
PEGylierung	Einbau von Polyethylenglykol in die Membran
P-Lyso PC	1-Palmitoyl-2hydroxy- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
s.c.	subkutan
T _m	Phasenumwandlungstemperatur
TSL	thermosensitive Liposomen
TSL(Dox)	in TSL eingeschlossenes Dox
TSL(Gem)	in TSL eingeschlossenes Gem
TSL(Mito)	in TSL eingeschlossenes Mito
TUR	transurethrale resektion
WST-1	water-soluble tetrazolium salt

10.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Phospholipide; hydrophobe Fettsäureketten, hydrophile Kopfgruppen und Phasenumwandlungstemperatur T_m	8
Tabelle 2 - Übersicht Lipide für die Herstellung von Liposomen	17
Tabelle 3 - Übersicht Zytostatika.....	18
Tabelle 4 - Übersicht Zelllinien	18
Tabelle 5 - Übersicht Versuchstiere	19
Tabelle 6 - Charakterisierung von Liposomen A TSL(Gem), B TSL(Dox); c_{Lipid} = Lipidkonzentration, $c_{Wirkstoff}$ = Wirkstoffkonzentration, Wirkstoff/Lipid = Wirkstoff zu Lipid Verhältnis, ζ = ζ -Potential, Vesikelgröße = Liposomengröße, PDI = Polydispersionsindex, DC = Dünnschichtchromatographie.....	26
Tabelle 7 - Bedingungen Zellkultivierung	28
Tabelle 8 - Passagieren der Zellen	29
Tabelle 9 - WST-1-Test; Erstellen der Verdünnungsreihe.....	33
Tabelle 10 - Überblick Pharmakokinetikstudien	37
Tabelle 11 - Übersicht der Therapiestudie mit Gem.....	40
Tabelle 12 - Übersicht Gruppen; Anreicherung und Organverteilung Dox; i.v. = intravenös.....	43
Tabelle 13 - Charakterisierung von TSL(Mito); c_{Lipid} = Lipidkonzentration, $c_{Wirkstoff}$ = Wirkstoffkonzentration, Wirkstoff/Lipid = Wirkstoff zu Lipid Verhältnis, ζ = ζ -Potential, Vesikelgröße = Liposomengröße, PDI = Polydispersionsindex, DC = Dünnschichtchromatographie.....	46
Tabelle 14 - IC_{50} für die Behandlung der Zelllinie BN175; Behandlung \pm HT und Dox, Gem oder Mito, IC_{50} = mittlere inhibitorische Konzentration, R^2 = Grad der Bestimmtheit, n = Anzahl	49
Tabelle 15 - IC_{50} für die Behandlung der Zelllinie AY27; Behandlung \pm HT und Dox, Gem oder Mito, IC_{50} = mittlere inhibitorische Konzentration, R^2 = Grad der Bestimmtheit, n = Anzahl	50
Tabelle 16 - IC_{50} für die Behandlung der Zelllinie DHD/K12/TRb; Behandlung \pm HT und Dox, Gem oder Mito, IC_{50} = mittlere inhibitorische Konzentration, R^2 = Grad der Bestimmtheit, n = Anzahl	51
Tabelle 17 - Mito-Plasmakonzentration nach i.v.-Applikation von 0,1 mg/kg TSL(Mito).....	52
Tabelle 18 - Dox-Plasmakonzentration; Injektion von 2 bzw. 5 mg/kg TSL(Dox); wiederholte Applikation von TSL(Dox) 2 mg/kg nach 7 bzw. 14 Tagen; c_2 = Konzentration 2 min nach Injektion, $t_{1/2}$ = Plasmahalbwertszeit ($t_{1/2}$), R^2 = Grad der Bestimmtheit (engl.	

	<i>coefficient of determination</i>), $AUC_{0-120 \text{ min}}$ = Fläche unter der Plasmaspiegelkurve 0-120 min (engl. <i>Area under the curve</i>)	54
Tabelle 19	- Gem-Plasmakonzentration nach i.v.-Applikation von 6 mg/kg TSL(Gem); c_2 = Konzentration 2 min nach Injektion, $t_{1/2}$ = Plasmahalbwertszeit ($t_{1/2}$), R^2 = Grad der Bestimmtheit (engl. <i>coefficient of determination</i>), $AUC_{0-120 \text{ min}}$ = Fläche unter der Plasmaspiegelkurve 0-120 min (engl. <i>Area under the curve</i>)	55
Tabelle 20	- Pharmakokinetik TSL(Dox); Plasmakonzentrationen nach i.v. Injektion von 5 mg/kg bzw. 2 mg/kg c_2 = 2 min nach Injektion, $t_{1/2}$ = Plasmahalbwertszeit ($t_{1/2}$), c_0 = theoretisch mögliche Plasmakonzentration	81
Tabelle 21	- Dox Konzentrationen in den Organen nach einstündiger systemischer Behandlung mit TSL(Dox) +HT bzw. Dox +HT oder intravesikaler Therapie –HT	89
Tabelle 22	- Dox-Konzentrationen Blase ± Tumorgewebe, bei der Therapie TSL(Dox) +HT systemisch oder Dox intravesikal –HT, 5 mg/kg und 0,5 mg/Tier	91
Tabelle 23	- Übersicht Chemikalien für die Liposomenherstellung und Charakterisierung	115
Tabelle 24	- Übersicht Reagenzien für die Liposomenherstellung und Charakterisierung	116
Tabelle 25	- Übersicht Verbrauchsmaterial für die Liposomenherstellung und Charakterisierung	116
Tabelle 26	- Übersicht Geräte für die Liposomenherstellung und Charakterisierung	117
Tabelle 27	- Übersicht verwendete Medikamente in der Zellkultur	118
Tabelle 28	- Übersicht verwendete Chemikalien in der Zellkultur	118
Tabelle 29	- Übersicht verwendete Reagenzien in der Zellkultur	119
Tabelle 30	- Übersicht verwendete Verbrauchsmaterial in der Zellkultur	119
Tabelle 31	- Übersicht verwendete Geräte in der Zellkultur	120
Tabelle 32	- Übersicht im Tierversuch eingesetzte Arzneimittel	121
Tabelle 33	- Übersicht im Tierversuch eingesetzte Reagenzien	121
Tabelle 34	- Übersicht im Tierversuch eingesetztes Verbrauchsmaterial	122
Tabelle 35	- Übersicht im Tierversuch eingesetzte Geräte	122
Tabelle 36	- Übersicht für HPLC Analytik eingesetzte Chemikalien und Reagenzien	123
Tabelle 37	- Übersicht für HPLC Analytik eingesetzte Standards	123
Tabelle 38	- Übersicht für HPLC Analytik eingesetztes Verbrauchsmaterial	124
Tabelle 39	- Übersicht für HPLC Analytik eingesetzte Geräte	124
Tabelle 40	- Verwendete Software; Bearbeitung und Auswertung	125

10.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Struktur und Aufbau eines Liposoms	3
Abbildung 2 – Schematische Darstellung A der Freisetzung aus Liposomen und B der Membranphasen; $T < T_m$ solide Gelphase, niedrige Permeabilität für hydrophile Moleküle; $T > T_m$ flüssig-kristalline Phase, erhöhte Permeabilität für hydrophile Moleküle	5
Abbildung 3 - Wärmeinduzierte intravaskuläre Wirkstofffreisetzung aus TSL und Wirkstoffakkumulation im Zielgewebe	7
Abbildung 4 – Chemische Struktur der Phospholipide DPPC, DSPC und DPPG ₂ und die Bildung lamellarer Strukturen von Phospholipiden in wässriger Lösung	8
Abbildung 5 - WST-1-Test; Beimpfte 96-Well-Mikrotiterplatte und Behandlung der Zellen mit Wirkstoff der Verdünnungsreihe .	33
Abbildung 6 - Aufbau Lampenhyperthermie; 1 Inhalationsmaske für Narkose, 2 Kaltlichtlampe, 3 Tumortragende Hintergliedmaße, 4 Erwärmung mit Licht, 5 rektale Temperatursonde, 6 i.v. Zugang <i>V. coccygea lateralis</i> , 7 Temperaturmessgerät	39
Abbildung 7 - Schematische Darstellung der Hyperthermiebehandlung der Blase;	42
Abbildung 8 - Temperaturabhängige Mito-Freisetzung;	47
Abbildung 9 - Zytotoxizitätstest BN175 Zellen; 48 h nach Behandlung Dox +HT	48
Abbildung 10 Dosis-Wirkungskurve für die Zelllinie BN175	48
Abbildung 11 - Zytotoxizitätstest AY27; 48 h nach Behandlung mit Gem -HT	49
Abbildung 12 Dosis-Wirkungskurve für die Zelllinie AY27	50
Abbildung 13 Dosis-Wirkungskurve für die Zelllinie DHD/K12/TRb	51
Abbildung 14 - Dox-Plasmakonzentrationskurve; TSL(Dox) 2 mg/kg Tag 0 (n = 7) mit wiederholter Injektion an Tag 7 (n = 3) bzw. Tag 14 (n = 3)	54
Abbildung 15 - Gem-Plasmakonzentrationskurve; TSL(Gem) 6 mg/kg i.v. (n=3)	55
Abbildung 16 - Tumorwachstumsstudie Weichteilsarkom BN175; Behandlung mit 6 mg/kg Gem i.v +/- HT; alle Gruppen n = ≥6 außer TSL(Gem) +HT Wasserbad n = 3; Foto: Hautläsionen nach Behandlung mit TSL(Gem) –HT;	57
Abbildung 17 - Zystoskopie Blase; Umfangsvermehrung sieben Tage nach AY27-Tumorzellinstillation	59
Abbildung 18 - Makroskopisch erkennbare Umfangsvermehrungen in der eröffneten Rattenblase; sieben Tage nach AY27-Tumorzellinstillation	59

Abbildung 19 - Histologie Blase F344 Ratten; (A) unauffällige Blasenschleimhaut (x10); (B) pT1G3 Tumor sieben Tage nach Tumorzellinstillation (x10).....	59
Abbildung 20 - Aufbau HT-Behandlung Blase; 1 Wasserbad, 2 Peristaltikpumpe, 3 Katheter für zulaufende Flüssigkeit, 4 Katheter für ablaufende Flüssigkeit mit Temperatursonde, 5 Rektalsonde, 6 Temperaturmessgerät, 7 i.v. Injektion V. <i>coccygea lateralis</i>	61
Abbildung 21 - Temperaturkontrolle HT Blase; 1 Temperatur Wasserbad, 2 Temperatur in abfließender Flüssigkeit, 3 Körpertemperatur	62
Abbildung 22-Dox-Konzentration in der Milz; nach einstündiger Behandlung mit nicht-liposomalem Dox bzw. TSL(Dox) i.v. + HT Blase oder einstündiger Behandlung mit nicht-liposomalem Dox intravesikal -HT	64
Abbildung 23 -Dox-Konzentration in der Leber; nach einstündiger Behandlung mit nicht-liposomalem Dox bzw. TSL(Dox) i.v. + HT Blase oder einstündiger Behandlung mit nicht-liposomalem Dox intravesikal -HT	64
Abbildung 24 - Dox-Konzentration in der Niere; nach einstündiger Behandlung mit nicht-liposomalem Dox bzw. TSL(Dox) i.v. + HT Blase oder einstündiger Behandlung mit nicht-liposomalem Dox intravesikal -HT	65
Abbildung 25 - Dox-Konzentration im Herzen; nach einstündiger Behandlung mit nicht-liposomalem Dox bzw. TSL(Dox) i.v. + HT Blase oder einstündiger Behandlung mit nicht-liposomalem Dox intravesikal -HT	65
Abbildung 26 - Dox-Konzentration im Urothel (SH) und in der <i>Tunica muscularis</i> (TM) der Blase ohne Tumor; einstündige systemische oder intravesikale Therapie, 5 mg/kg nicht-liposomales Dox oder TSL(Dox) ±HT Blase	67
Abbildung 27 - Dox-Konzentration im Urothel (SH) und in der <i>Tunica muscularis</i> (TM) der Blase ± Tumor; einstündige systemische oder intravesikale Therapie, 5 mg/kg nicht-liposomales Dox – HT oder TSL(Dox) +HT Blase	68
Abbildung 28 - Dox-Konzentrationen im Urothel (SH) und in der <i>Tunica muscularis</i> (TM) der Blase ± Tumor; 5 mg/kg TSL(Dox) i.v. +HT	68
Abbildung 29 - Blase F344 Ratte; Therapie mit 5 mg/kg Dox;	69
Abbildung 30 - Dox-Konzentration im Plasma; nach einstündiger Behandlung mit nicht-liposomalem Dox bzw. TSL(Dox) i.v. + HT Blase, oder einstündiger Behandlung mit nicht-liposomalem Dox intravesikal -HT	69

10.5 Veröffentlichungen

Publikation

Gemcitabine Treatment of Rat Soft Tissue Sarcoma with Phosphatidylidiglycerol-Based Thermosensitive Liposomes

Simone Limmer & Jasmin Hahn & Rebecca Schmidt & Kirsten Wachholz & Anja Zengerle & Katharina Lechner & Hansjörg Eibl & Rolf D. Issels & Martin Hossann & Lars H. Lindner

Pharmaceutical Research, Januar 2014

Vorträge

Targeted tumor therapy with phosphatidyloligoglycerol-based thermosensitiv liposomes in a rat sarcoma model

Simone Limmer, Jasmin Hahn, Rebecca Schmidt, Anja Zengerle, Kirsten Wahholz, Hansjörg Eibl, Rolf D. Issels, Martin Hossann, Lars H. Lindner
Ameland, 21st Mountain/Sea Liposoe Workshop, 27. September 2012

Thermosensitive liposomes encapsulating gemcitabine

Simone Limmer, Jasmin Hahn, Rebecca Schmidt, Kirsten Wachholz, Anja Zengerle, Katharina Lechner, Hansjörg Eibl, Rolf D. Issels, Martin Hossann, Lars H. Lindner
Aruba, 30th Annual Meeting Society for Thermal Medicine, 24. April 2013

Thermosensitive Liposomes and Hyperthermia in an orthotopic rat bladder tumor model

Simone Limmer, Kirsten Wachholz, Anja Zengerle, Rolf D. Issels, Martin Hossann, Lars H. Lindner

Herrsching, 15. Wissenschaftliches Symposium der Medizinischen Klinik und Poliklinik III, July 2013

Poster**Thermosensitive liposomes and hyperthermia in an orthotopic rat bladder tumor model**

Simone Limmer, Kirsten Wachholz, Anja Zengerle, Alexander Roosen, Rolf D. Issels, Martin Hossann, Lars H. Lindner

München, 28th Annual Meeting European Society for Hyperthermic Oncology

